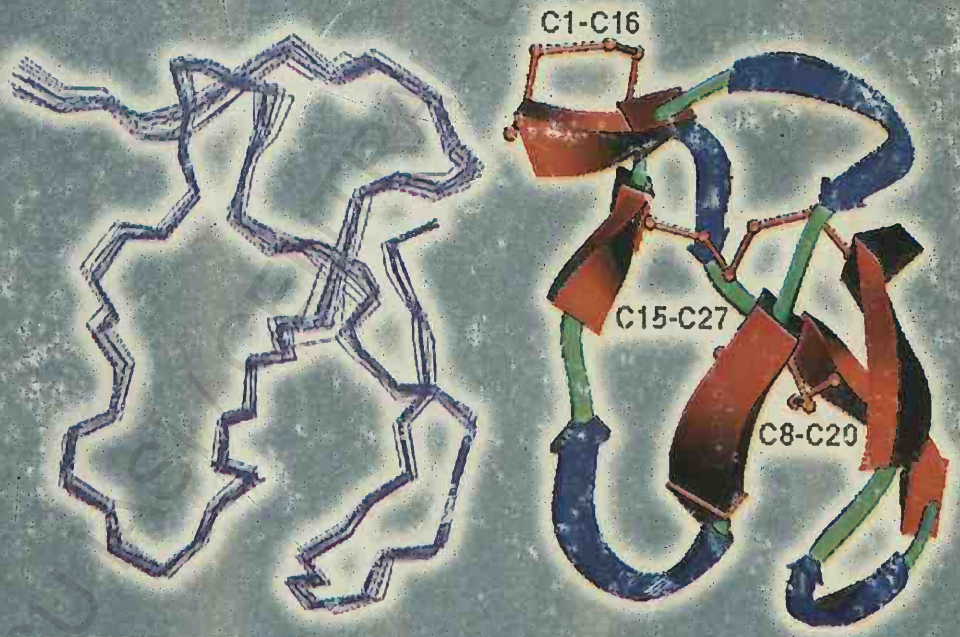
Tudor Luchian

INTRODUCERE ÎN BIOFIZICA MOLECULARĂ ȘI CELULARĂ



III-12.547

EDITURA UNIVERSITĂȚII „ALEXANDRU IOAN CUZA" IAȘI

III 12.341

Tudor Luchian

INTRODUCERE ÎN BIOFIZICA MOLECULARĂ ŞI CELULARĂ

134176
B.C.U. - IASI

UNIVERSITATEA 'ALEXANDRU IOAN CUZA'
IAŞI – 2001

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Referenți științifici: **Prof.dr. GHEORGHE POPA**
Universitatea 'Al. I. Cuza' din Iași, Facultatea de Fizică

Prof.dr. AUREL POPESCU
Universitatea din București, Facultatea de Fizică

Prof. Dr. ION NEACȘU
Universitatea 'Al. I. Cuza' din Iași, Facultatea de Biologie

Conf.dr. VIOREL MELNIG
Universitatea 'Al. I. Cuza' din Iași, Facultatea de Fizică

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

MOTTO:

'O teorie nu trebuie să conțină nimic din ceea ce nu ar avea sens experimental și nu ar corespunde unui experiment, care, chiar dacă nu ar fi simplu de realizat, cel puțin să fie ușor de imaginat.'

Paul Langevin

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Cuprins

Prefață 7

1. **Funcțiile și structura proteinelor** 11
1.1. *Blocuri chimice constitutive. Structura primară* 13
1.2. *Structura secundară* 15
1.3. *Structura terțiară* 19

2. **Enzimele, catalizatori biologici** 23
2.1. *Ce sunt și cum își exercită enzimele funcția* 23
2.2. *Modelul Michaelis-Menten pentru descrierea proprietăților cinetice ale enzimelor* 27
2.3. *Mecanisme de reglare a funcțiilor enzimelor* 29

3. **Funcția biologică a acizilor nucleici** 35
3.1. *Structura acizilor nucleici* 35
3.2. *Organizarea ADN-ului în celulă* 37
3.3. *Principiile replicării ADN-ului* 39
3.4. *Expresia genelor* 40

4. **Teoria Debye-Hückel. Potențialul de membrană în aproximația Gouy-Chapman** 44

5. **Clasificarea forțelor intermoleculare** 56
5.1. *Interacțiunile van der Waals* 56
5.2. *Energia Born* 62
5.3. *Interacții polare. Hidratarea macromoleculelor* 63

6. **Proprietățile ATP-ului și rolul său central în bioenergetică** 67

7. **Structura și compoziția biomembranelor** 71
7.1. *Modelul bistrat de organizare a biomembranelor* 75
7.2. *Modele de organizare a proteinelor în biomembrane* 79
7.3. *Modele de organizare a moleculelor de carbohidrați în biomembrane* 83

8. **Proprietăți electrice elementare ale bistraturilor lipidice** 85

9. **Transportul ionilor prin biomembrane** 93

10. **Potențialul transmembranar de repaus al celulelor biologice** 101
10.1. *Ecuația lui Smoluchowski* 102
10.2. *Ecuația lui Kramer* 107
10.3. *Ecuația lui Nernst* 108
10.4. *Circuitul electric echivalent al unei membrane cu proprietăți de semipermeabilitate ionică* 111
10.5. *Potențialul Donnan* 113

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

11. **Ecuația lui Goldman. Reprezentarea electrică echivalentă a unei membrane biologice permeabile pentru mai multe specii ionice** 119
11.1. *Variația concentrației ionilor difuzanți prin membrana celulară. Schița electrică echivalentă a unei membrane permeabile pentru mai multe specii ionice* 123
11.2. *Contribuții electrice locale la formarea diferenței de potențial transmembranar al unei membrane biologice* 126

12. **Neurobiofizică** 130
12.1. *Elemente de arhitectură a sistemului nervos la organisme superioare* 130
12.2. *Tehnica de măsurare a curenților electrici transmembranari în condiții de voltaj fixat ('voltage-clamp')* 135
12.3. *Conducția potențialului de acțiune în membrana celulară excitabilă. Modelul Hodgkin-Huxley* 140

13. **Propagarea perturbațiilor electrice în membranele biologice. Teoria cablului** 154

14. **Canale ionice. Funcție, structură și clasificare** 163
14.1. *Canale ionice ligand-dependente. Receptorul nicotinic de acetilcolină* .. 170
14.2. *Canale ionice voltaj-dependente* 177

15. **Tehnica 'patch-clamp' de studiere a canalelor ionice** 192
15.1. *Elemente și principii de construcție utilizate în realizarea amplificatoarelor de tip 'patch-clamp'* 195
15.2. *Principii de interpretare stochastică a semnalelor electrice de tip 'patch-clamp'* 201

16. **Modele de permeație ionică a canalelor ionice** 215
16.1. *Teoria Nernst-Planck* 216
16.2. *Ecuația lui Langevin* 221
16.3. *Teoria lui Eyring* 223

17. **Metoda fluctuațiilor de curent în analiza proprietăților electrice ale biomembranelor** 229

18. **Comunicarea celulară** 241
18.1. *Strategii de comunicare celulară* 241
18.2. *Clasificarea moleculelor utilizate în comunicarea celulară din punct de vedere al solubilității în apă* 243
18.3. *Clasificarea receptorilor transmembranari implicați în procesele de comunicare intercelulară* 244
18.4. *Modul de acțiune al opiaților la nivel celular* 255

Bibliografie 257

Anexe 261

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Prefață

Unele dintre cele mai incitante paradigme ale științei contemporane apar atunci când cercetători cu pregătire științifică diferită converg, prin natura proiectelor de cercetare, în încercarea de a explica fenomene noi, de interes științific mutual. În ultimii 40 de ani, o mare parte din tendințele majore de dezvoltare a științei s-au reflectat într-o astfel de convergență a unor discipline relativ variate, cum ar fi fizica, matematica, biologia moleculară și celulară, biochimia, genetica, iar scopul declarat al acestei simbioze de discipline științifice (denumită curent 'Științele Vieții'*) a fost descifrarea și explicarea proceselor și fenomenelor care fundamentează existența materiei vii.*

Unul dintre domeniile fundamentale ale Științelor Vieții este reprezentat de Biofizică. *Așa după cum este sugerat și de nume, biofizica este știința care încearcă explicarea cât mai exactă și cuantificată a fenomenelor ce însoțesc existența vieții, de la moleculă la agregat celular, prin prisma descrierii biologice primare corelată cu analiza judicioasă, fizico-matematică, a proceselor din sistemele vii. Din punct de vedere al dezvoltării structurale și implicare în aspectele cotidiene de existență, biofizica este o știință relativ nouă; se poate însă afirma că data probabilă de naștere a acestei științe este situata în jurul anului 1791, când Galvani a efectuat primele experimente de fizică pe țesut biologic activ și a observat posibilitatea controlării contracției mușchiului de broască cu ajutorul unor descărcări electrice aplicate focal pe unul din nervi. Dezvoltarea foarte rapidă a fizicii s-a reflectat pozitiv și în 'maturizarea' deplină a biofizicii; astăzi, biofizica este știință de sine-stătătoare, care poate da răspunsuri esențiale în explicarea afecțiunilor neurologice, contribuie decisiv la dezvoltarea de noi medicamente pentru diferite boli, încearcă explicarea funcționării integrative a celulelor și a canalelor ionice. În această perspectivă, biofizicianul are un statut deosebit în comparație cu un matematician, biolog sau fizician. Prin pregătirea sa științifică, el poate înțelege și aborda experimental și teoretic procesele fizice pe care este consolidată Viața; aceasta însă, implică dezvoltarea sa științifică 'enciclopedică'. Biofizicianul trebuie să studieze în egală măsură fizica, matematica, bazele biologiei și farmacologiei; orice încercare de studiere explicativă (și nu doar descriptivă) a proceselor biologice nu se poate face fără această pregatire de bază. Toate companiile farmaceutice importante, labora-*

BCU CLUJ

toarele de cercetare afiliate spitalelor sau companiile implicate comercial în explicarea proceselor fizice din materia vie, au în cadrul grupului propriu de cercetători biofizicieni. *Datorită rangului lor științific, biofizicienii reprezintă interfața esențială între o știința eminamente descriptivă (e.g., biologia) și una explicativă, însă 'biologic-inactivă' (e.g., fizica). În una din cărțile sale ('*Șocul viitorului'*), Alvin Toeffler surprinde foarte bine tendința care trebuie urmată în ceea ce privește dezvoltarea științifică contemporană:* '...dacă vrem ca ai noștri copii să se adapteze cu mai mult succes la schimbarea rapidă, trebuie sa-i sensibilizăm la posibilitățile și probabilitățile de mâine. Trebuie să le accentuăm simțul viitorului'.

Poziția actuală a instituțiilor guvernamentale și private din Europa Occidentală, Australia, Canada și SUA față de finanțarea științifică, dovedește că statele moderne au înțeles tendința de urmat în dezvoltarea științifică viitoare, prin susținerea financiară generoasă a Științelor Vieții, și în particular a biofizicii.

Această carte a fost concepută cu scopul de a prezenta cititorului interesat câteva din cele mai importante concepte si paradigme ale biofizicii contemporane, care să-l ajute la înțelegerea mai exactă a unor fenomene descrise de biologia moleculară și celulară modernă. În cadrul acestei științe interdisciplinare, revoluția tehnologică la care asistăm contribuie esențial la posibilitatea realizării de experimente care, prin structură și posibilități de explorare științifică, reactualizează la aproape fiecare șase luni cunoștințele despre procesele biofizice ce au loc în celulele vii. De aceea, am încercat utilizarea de referințe științifice cât mai noi, care să sugereze stadiul actual de dezvoltare al ideilor științifice în biofizica modernă.

Vreau să menționez că apariția acestei lucrări a fost facilitată de sprijinul generos al domnilor prof.dr. Gheorghe Popa (Facultatea de Fizică, Universitatea 'Alexandru I. Cuza' din Iași) și prof.dr. Aurel Popescu (Facultatea de Fizică, Universitatea din Bucuresti), care mi-au sugerat numeroase modalități de îmbunătățire calitativă a conținutului acestei cărți. Mulțumiri sunt adresate și domnilor prof.dr. Ion Neacșu și conf.dr. Viorel Melnig, care au avut de asemenea amabilitatea de a fi referenți ai manuscrisului acestui curs.

Nu în cele din urma însă, doresc să mulțumesc soției mele, pentru sprijinul susținut adus în redactarea și corectura manuscrisului original.

Printre eforturile autorului și referenților, s-a numărat și acela de a elimina virtual toate erorile literare sau de altă natură din textul prezent. Cu toate acestea, autorul încurajează și mulțumește anticipat pentru orice critici aduse acestui manuscris, cu scopul îmbunătățirii sale calitative și cantitative.

Autorul

BCU

1. Funcțiile şi structura proteinelor

Datorită rolului esențial jucat de structurile proteice în constituirea fundamentului material al celulelor vii şi al vieții, este foarte important de revăzut câteva dintre caracteristicile cele mai importante ale acestora.

Proteinele sunt macromolecule care, în cursul evoluției biologice, au apărut şi s-au dezvoltat în aşa fel încât să constitue elemente esențiale pentru aproape toate procesele biologice. Pentru a sublinia şi fundamenta această afirmație, sunt prezentate în continuare câteva din cele mai importante procese biologice în care proteinele reprezintă structuri organizate de bază:

a. **Cataliza enzimatică** – Aproape toate reacțiile biochimice ce au loc în sistemele biologice sunt reacții catalizate, iar absența enzimelor specifice implicate (care în marea majoritate a cazurilor sunt structuri proteice) într-o anumită reacție sau prezența lor în stare degradată are consecințe negative asupra cineticii reacției biochimice respective. Este suficient de amintit că, cele mai multe reacții biochimice desfăşurate *in vivo*, au viteze de reacție aproape imperceptibile în absența enzimelor; în prezența enzimelor, viteza reacțiilor (catalizate) creşte de ordinul milioanelor.

b. **Fenomene de transport** – O importanță foarte mare pentru transportul unor ioni şi molecule mici cu rol esențial în desfăşurarea multor funcții fiziologice o au anumite proteine specifice. Un exemplu clasic în acest sens îl constituie transportul oxigenului în eritrocite de către hemoglobină. În țesutul muscular, mioglobina, care este o proteină similară structural cu hemoglobina, este responsabilă pentru procesul de transport al oxigenului.

c. **Mişcarea coordonată** – O componentă majoră a țesutului muscular, ce este responsabil pentru existența mişcării coordonate, o constituie prezența unor structuri proteice specifice (e.g., actină, miozină).

d. **Suport mecanic** – Colagenul, ca proteină fibroasă, este componenta esențială a pielii, țesuturilor osoase şi tendoanelor.

e. **Imunoprotecție** – Anticorpii sunt proteine cu specificitate extrem de mare pentru recunoaşterea şi interacțiunea cu substanțe străine unui anumit organism, ca: viruşi, bacterii, celule provenind din alte organisme.

BCU CLUJ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

f. **Generarea şi transmiterea potenţialelor de acţiune** – Răspunsul diferitelor membrane excitabile la acţiunea diferiţilor stimuli este mediat de prezenţa în membrană a unor proteine extrem de importante pentru comunicarea celulară, denumite 'canalele ionice' (într-un capitol ulterior, vor fi prezentate detalii structurale şi funcţionale ale canalelor ionice).

Elementele structurale de bază ce intră în alcătuirea proteinelor sunt aminoacizii. Grupările chimice de bază ce alcătuiesc orice aminoacid sunt următoarele: o grupare amino, o grupare carboxil, un atom de hidrogen şi o grupare chimică notată de obicei cu R şi care reprezintă amprenta distinctivă a unui anumit aminoacid. Toate aceste blocuri chimice interacţionează cu un atom de carbon (Fig. 1).

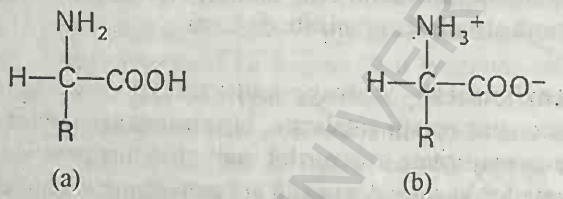


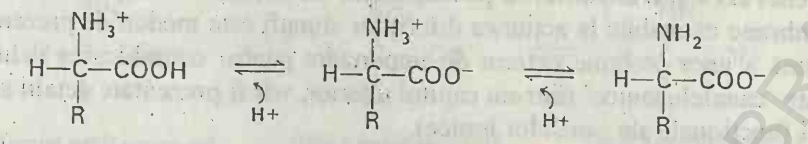
Fig. 1. Structura chimică generală a aminoacizilor în forma neionizată (a) şi dublu-ionizată (b) [*Biochemistry (4th edition), 1995. Stryer, L.*]

La o valoare neutră a pH-ului soluţiei în care se află, aminoacizii au preponderent caracter electric de ioni dipolari ('zwitterioni') în care gruparea amino este în stare protonată ($-NH_3^+$), iar gruparea carboxil este disociată ($-COO^-$).

Noţiunea de ion dipolar ('zwitterion') trebuie înţeleasă în următorul mod: spre deosebire de dipoli (aşa cum sunt definiţi în fizica clasică), pentru care sarcina pozitivă a respectivului dipol este egală numeric cu sarcina negativă a lui, în cazul anumitor aminoacizi (aşa cum va fi prezentat în continuare) sarcina netă pozitivă nu este egală în mod necesar cu cea negativă. Deci, pe lângă existenţa unui dipol, se poate evidenţia pe unii aminoacizi şi prezenţa unei sarcini (pozitive sau negative) nete diferită de zero.

Trebuie însă menţionat că starea de ionizare a unui aminoacid (şi deci sarcina sa electrică netă) variază puternic cu pH-ul mediului în care el se află (Fig. 2).

Toţi aminoacizii întâlniţi în natură sunt optic-activi (există aşa-numiţii l- şi d-izomeri). Trebuie menţionat că denumirile de 'l-izomer' (*levogir*) şi respectiv 'd-izomer' (*dextrogir*) sunt derivate din observaţii experimentale despre modul în care medii constituite din aceşti compuşi rotesc planul de polarizare a unei radiaţii electromagnetice liniar polarizate (spre stânga şi respectiv dreapta).



forma predominantă la pH = 1 | forma predominantă la pH = 7 | forma predominantă la pH = 11

Fig. 2. Reprezentarea stărilor de ionizare ale unui aminoacid în funcție de valoarea pH-ului soluției în care se află [*Biochemistry (4th edition), 1995. Stryer, L.*]

1.1. *Blocuri chimice constitutive. Structura primară*

Experimente efectuate în ultimele decenii au demonstrat că toate proteinele existente în speciile vii sunt compuse din doar 20 de aminoacizi. Remarcabila pleiadă de funcții a proteinelor (așa cum a fost evidențiată mai sus) este realizabilă doar cu contribuția unui număr relativ mic de aminoacizi datorită extraordinarei diversități în care acești aminoacizi se pot combina în structura primară cât și terțiară, pentru a genera proteine cu funcții specifice.

În continuare, sunt prezentați acești 20 de aminoacizi, grupați pe criterii de proprietăți fizico-chimice comune; termenii din pararantezele din dreptul fiecărui aminoacid reprezintă modalitățile de abreviere a denumirii acestor aminoacizi, așa cum sunt folosite în biologia moleculară modernă.

a. Glicina (**Gly, G**); Alanina (**Ala, A**); Valina (**Val, V**); Leucina (**Leu, L**); Isoleucina (**Ile, I**) – *aminoacizi neutri la pH neutru*

Grupările specifice R ale acestor aminoacizi (e.g., $-CH_3$ pentru alanină, $-CH_2-CH_3$ pentru isoleucină) conferă acestor aminoacizi un puternic caracter hidrofobic. Astfel, așa după cum vom vedea în capitolele următoare, în soluție apoasă, acești aminoacizi au tendința de a-și ordona aceste lanțuri specifice în așa fel încât ele să evite contactul direct cu mediul apos.

b. Fenilalanina (**Phe, F**); Tirozina (**Tyr, Y**); Triptofan (**Trp, W**) – *aminoacizi neutri la pH neutru*

Grupările R ale acestor amioacizi au caracter aromatic; fenilalanina și triptofanul sunt puternic hidrofobi (datorită prezenței grupărilor metilen și indol legat de gruparea metilen), iar tirozona (datorită prezenței unei grupări hidroxil) este mai puțin hidrofob decât ceilalți doi.

c. Cisteina (**Cys, C**); Metionina (**Met, M**) – *aminoacizi neutri la pH neutru*

Acești aminoacizi conțin în lanțurile adiacente R o grupare sulfhidril (–SH), respectiv atom de sulf într-o legătură tioeterică ($-S-CH_3$). Acești aminoacizi au caracter hidrofob și, prezența

f. **Generarea şi transmiterea potenţialelor de acţiune** – Răspunsul diferitelor membrane excitabile la acţiunea diferiţilor stimuli este mediat de prezenţa în membrană a unor proteine extrem de importante pentru comunicarea celulară, denumite 'canalele ionice' (într-un capitol ulterior, vor fi prezentate detalii structurale şi funcţionale ale canalelor ionice).

Elementele structurale de bază ce intră în alcătuirea proteinelor sunt aminoacizii. Grupările chimice de bază ce alcătuiesc orice aminoacid sunt următoarele: o grupare amino, o grupare carboxil, un atom de hidrogen şi o grupare chimică notată de obicei cu R şi care reprezintă amprenta distinctivă a unui anumit aminoacid. Toate aceste blocuri chimice interacţionează cu un atom de carbon (Fig. 1).

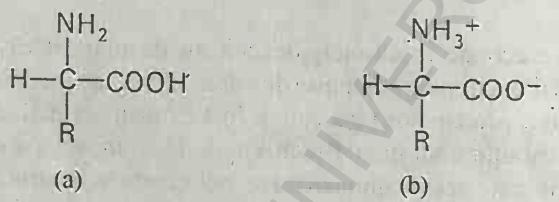


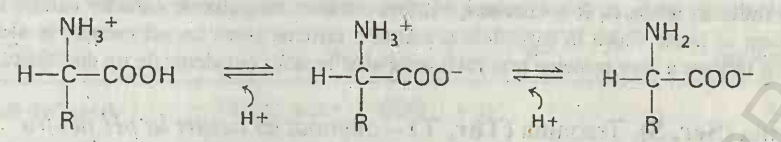
Fig. 1. Structura chimică generală a aminoacizilor în forma neionizată (a) şi dublu-ionizată (b)

La o valoare neutră a pH-ului soluţiei în care se află, aminoacizii au preponderent caracter electric de ioni dipolari ('zwitterioni') în care gruparea amino este în stare protonată ($-NH_3^+$), iar gruparea carboxil este disociată ($-COO^-$).

Noţiunea de ion dipolar ('zwitterion') trebuie înţeleasă în următorul mod: spre deosebire de dipoli (aşa cum sunt definiţi în fizica clasică), pentru care sarcina pozitivă a respectivului dipol este egală numeric cu sarcina negativă a lui, în cazul anumitor aminoacizi (aşa cum va fi prezentat în continuare) sarcina netă pozitivă nu este egală în mod necesar cu cea negativă. Deci, pe lângă existenţa unui dipol, se poate evidenţia pe unii aminoacizi şi prezenţa unei sarcini (pozitive sau negative) nete diferită de zero.

Trebuie însă menţionat că starea de ionizare a unui aminoacid (şi deci sarcina sa electrică netă) variază puternic cu pH-ul mediului în care el se află (Fig. 2).

Toţi aminoacizii întâlniţi în natură sunt optic-activi (există aşa-numiţii l- şi d-izomeri). Trebuie menţionat că denumirile de 'l-izomer' (*levogir*) şi respectiv 'd-izomer' (*dextrogir*) sunt derivate din observaţii experimentale despre modul în care medii constituite din aceşti compuşi rotesc planul de polarizare a unei radiaţii electromagnetice liniar polarizate (spre stânga şi respectiv dreapta).



forma predominantă la pH = 1 | forma predominantă la pH = 7 | forma predominantă la pH = 11

Fig. 2. Reprezentarea stărilor de ionizare ale unui aminoacid în funcție de valoarea pH-ului soluției în care se află

1.1. *Blocuri chimice constitutive. Structura primară*

Experimente efectuate în ultimele decenii au demonstrat că toate proteinele existente în speciile vii sunt compuse din doar 20 de aminoacizi. Remarcabila pleiadă de funcții a proteinelor (așa cum a fost evidențiată mai sus) este realizabilă doar cu contribuția unui număr relativ mic de aminoacizi datorită extraordinarei diversități în care acești aminoacizi se pot combina în structura primară cât și terțiară, pentru a genera proteine cu funcții specifice.

În continuare, sunt prezentați acești 20 de aminoacizi, grupați pe criterii de proprietăți fizico-chimice comune; termenii din pararantezele din dreptul fiecărui aminoacid reprezintă modalitățile de abreviere a denumirii acestor aminoacizi, așa cum sunt folosite în biologia moleculară modernă.

a. Glicina (**Gly, G**); Alanina (**Ala, A**); Valina (**Val, V**); Leucina (**Leu, L**); Isoleucina (**Ile, I**) – *aminoacizi neutri la pH neutru*

Grupările specifice R ale acestor aminoacizi (e.g., $-CH_3$ pentru alanină, $-CH_2-CH_3$ pentru isoleucină) conferă acestor aminoacizi un puternic caracter hidrofobic. Astfel, așa după cum vom vedea în capitolele următoare, în soluție apoasă, acești aminoacizi au tendința de a-și ordona aceste lanțuri specifice în așa fel încât ele să evite contactul direct cu mediul apos.

b. Fenilalanina (**Phe, F**); Tirozina (**Tyr, Y**); Triptofan (**Trp, W**) – *aminoacizi neutri la pH neutru*

Grupările R ale acestor amioacizi au caracter aromatic; fenilalanina și triptofanul sunt puternic hidrofobi (datorită prezenței grupărilor metilen și indol legat de gruparea metilen), iar tirozona (datorită prezenței unei grupări hidroxil) este mai puțin hidrofob decât ceilalți doi.

c. Cisteina (**Cys, C**); Metionina (**Met, M**) – *aminoacizi neutri la pH neutru*

Acești aminoacizi conțin în lanțurile adiacente R o grupare sulfhidril (–SH), respectiv atom de sulf într-o legătură tioeterică ($-S-CH_3$). Acești aminoacizi au caracter hidrofob și, prezența

sulfhidrilului în gruparea R a cisteinei, conferă acestuia un puternic caracter chimic reactiv. După cum se poate vedea în capitolele următoare, cisteina joacă un rol esențial în alcătuirea structurii terțiare a unor proteine prin realizarea unor legături covalente de tip disulfidic.

d. Serina (**Ser, S**); Treonina (**Thr, T**) – *aminoacizi neutri la pH neutru*
Aceşti doi aminoacizi conţin în lanţurile lor R gruparea hidroxil (–OH), fapt ce le oferă caracter hidrofilic şi reactiv chimic.

e. Lisina (**Lys, K**); Arginina (**Arg, R**); Histidina (**His, H**) – *aminoacizi bazici la pH neutru*
Aceşti aminoacizi conţin în lanţurile R grupări cu puternic caracter polar, având caracter hidrofilic accentuat. Suplimentar, aminoacizii lisina şi arginina sunt încărcaţi electric pozitiv la pH neutru, pe când valoarea sarcinii electrice nete a histidinei (neutră sau pozitivă) este foarte sensibilă la prezenţa altor grupări chimice în imediata sa vecinatate.

f. Aspartat (**Asp, D**); Glutamat (**Glu, E**) – *aminoacizi acidici la pH neutru*
Aspartatul şi glutamatul sunt încărcaţi electric negativ permanent la pH neutru.

g. Asparagina (**Asn, N**); Glutamina (**Gln, Q**) – *aminoacizi neutri la pH neutru*
Asparagina şi glutamina sunt 'versiunile' neutre ale aspartatului şi glutamatului, deoarece conţin în lanţurile R gruparea amidă ($C–O–NH_2$) în locul grupării carboxilat (COO^-).

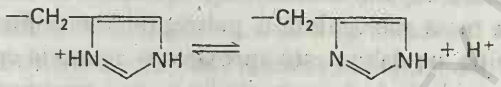
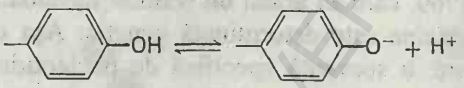
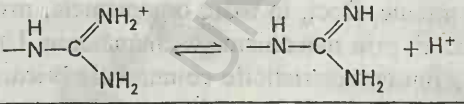
h. Prolina (**Pro, P**) – *aminoacid neutru la pH neutru*
Caracteristica distinctivă a prolinei este că, spre deosebire de ceilalţi aminoacizi, are două grupări amino.

Dintre aceşti aminoacizi, şapte au lanţuri foarte uşor ionizabile (Tabel 1).

Prin urmare, atunci când sunt prezenți în structura unei peptide sau proteine, aceşti aminoacizi pot produce schimbări dramatice de sarcină netă a structurii din care fac parte în funcție de valoarea pH-ului, a tăriei ionice şi temperaturii mediului în care se află. În ceea ce priveşte rezultatul acestei caracteristici la scară macroscopică, două sau mai multe peptide, proteine sau domenii ale aceleaşi proteine interacționează prin intermediul acestor aminoacizi, sensibil diferit în funcție de proprietățile fizico-chimice ale mediului de reacție.

Apariția şi frecvența de apariție a acestor aminoacizi în compoziția chimică a unei peptide sau proteine poartă numele de structură primară a respectivului compus. Cu alte cuvinte, când suntem interesați în deducerea structurii primare a unei peptide sau proteine, întrebarea la care trebuie răspuns este tipul aminoacizilor constituenți, precum şi frecvențelor de apariție în secvența liniară a respectivului compus.

Tabel 1. Valorile pK-ului pentru diferite grupări ionizabile din structura proteinelor

Group	*Acid* $\rightleftharpoons$ *base* + H^+	*Typical pK**
Terminal carboxyl	$-COOH \rightleftharpoons -COO^- + H^+$	3.1
Aspartic and glutamic acid	$-COOH \rightleftharpoons -COO^- + H^+$	4.4
Histidine		6.5
Terminal amino	$-NH_3^+ \rightleftharpoons -NH_2 + H^+$	8.0
Cysteine	$-SH \rightleftharpoons -S^- + H^+$	8.5
Tyrosine		10.0
Lysine	$-NH_3^+ \rightleftharpoons -NH_2 + H^+$	10.0
Arginine		12.0

1.2. *Structura secundară*

Ca elemente constitutive ale peptidelor și proteinelor, aminoacizii sunt legați între ei prin legături covalente peptidice. Formarea unei legături peptidice între oricare 2 aminoacizi are loc cu eliberarea unei molecule de apă, după cum este exemplificat în figura de mai jos:

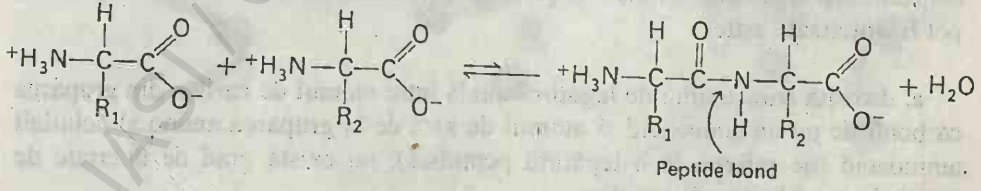


Fig. 3. Schema de reacție ce are loc la formarea unei legături peptidice (*'peptide bond'*) între doi aminoacizi [*Biochemistry (2nd edition), 1983. Armstrong, B. F.*]

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Trebuie menţionat că această reacţie este reversibilă, iar echilibrul său este deplasat în direcţia hidrolizei; altfel spus, reacţia prin care doi aminoacizi se unesc prin intermediul unei legături peptidice este o reacţie endoenergetică.

Mai mulţi aminoacizi legaţi prin intermediul legăturilor peptidice formează o polipeptidă. O convenţie des utilizată în biofizică şi biologia moleculară este aceea că începutul unui lanţ polipeptidic se află pe aminoacidul din structura polipeptidică ce are capătul amino liber. Unitatea de măsură cea mai utilizată pentru a estima masa moleculară a polipeptidelor şi proteinelor este *daltonul* (Da). Prin definiţie, un dalton este aproximativ numeric egal cu masa unui atom de hidrogen. Considerând că masa medie a unui aminoacid este 100 Da, masa totală a polipeptidelor variază între 5500 şi 220.000 Da. În anul 1953, cercetătorul Frederick Sanger a determinat secvenţa de aminoacizi a insulinei (hormon proteic). Acest rezultat a promovat o serie incisivă de studii de biologie moleculară în anii 1950-1960, care au arătat un rezultat formidabil: secvenţa de aminoacizi a oricărei proteine este determinată genetic. Aşa cum va fi prezentat în capitolele următoare, o secvenţă specifică de nucleotide în macromolecula de ADN determină o secvenţă bine definită (complementară) de nucleotide în macromolecula de ARN care induce secvenţa unică de aminoacizi în structura unei peptide sau proteine. Deci, în toate organismele, proteinele sunt sintetizate din aceiaşi aminoacizi, prin mecanisme asemănătoare. Un alt rezultat foarte important este că una din caracteristicile comune ale oricărei proteine se referă la structura sa tri-dimensională. Orice polipeptidă sau proteină în care aranjarea spaţială a aminoacizilor este perturbată, îşi pierde funcţia biologică. Deci, un corolar de bază este că funcţia unei proteine rezidă în conformaţia sa (aranjamentul tri-dimensional al atomilor în structura sa).

Încă din anul 1930, Linus Pauling şi Robert Corey au început studii de cristalografie cu raze X pentru a încerca elucidarea structurii aminoacizilor şi peptidelor. Ideea lor principală a fost de a obţine un set standard al distanţelor legăturilor interatomice precum şi al unghiurilor dintre legăturile interatomice ale aminoacizilor, urmând ca, ulterior, aceste informaţii să fie utilizate pentru predicţia conformaţiei tri-dimensionale a peptidelor şi proteinelor. Rezultatele lor primare pot fi sintetizate astfel:

a. datorită caracterului de legătură dublă între atomul de carbon din gruparea carbonil de pe un aminoacid şi atomul de azot de la gruparea amino al celuilalt aminoacid (ne referim la o legătură peptidică), nu există grad de libertate de rotaţie în jurul legăturii peptidice

b. lungimea legăturii peptidice este de 1,32 Å

c. legăturile între atomul de carbon al unui aminoacid și atomul de carbon din gruparea sa carbonil și atomul de azot din gruparea amino sunt legături simple ce prezintă un grad ridicat de libertate de rotație în jurul acestora.

Utilizând aceste informații și cumulându-le cu un volum substanțial de date experimentale de analiză structurală a peptidelor și proteinelor, Pauling și Corey au prezis în 1951 că toate structurile polipeptidice și proteice există în următoarele aranjamente tri-dimensionale: structura liniară de α-helix și structura planară de tip β ('β-sheet'). Structura secundară a unei polipeptide sau proteine se referă, deci, la maniera de aranjare spațială a unei secvențe de aminoacizi (α-helix sau structura planară β) și ce conferă astfel o funcție specifică acelei grupări.

O structură de tip α-helix are următoarea topografie:

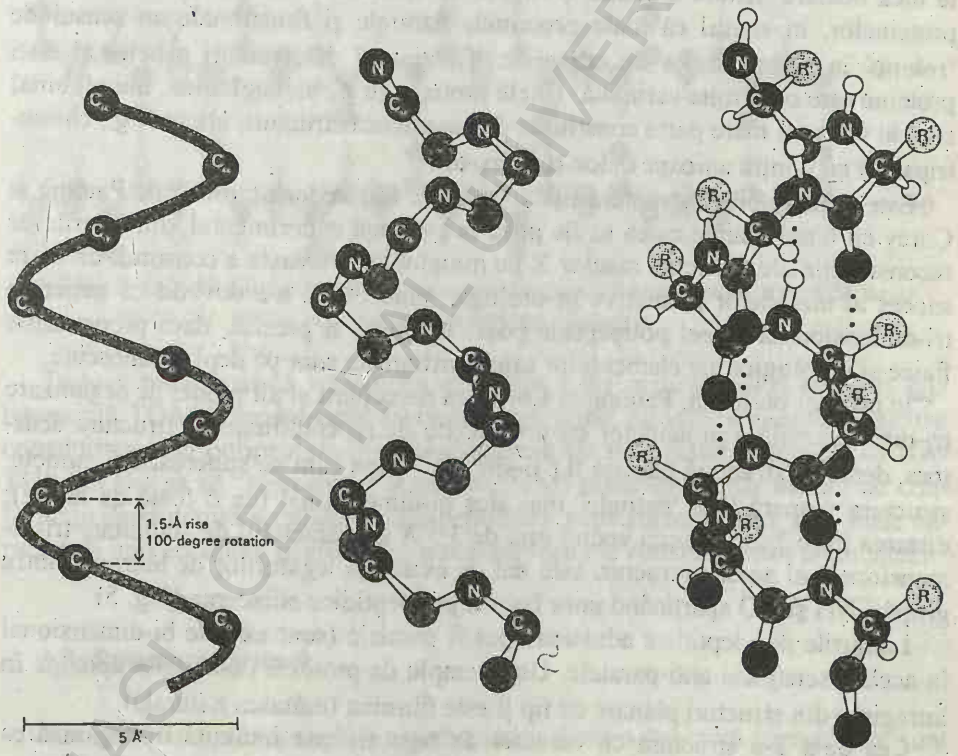


Fig. 4. Modelul spațial de structură geometrică secundară al unui domeniu peptidic de tip α-helix

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Astfel, această structură are topografia unui 'baston' drept, în care grupările adiacente R sunt expuse spre exterior iar caracterul de stabilitate al structurii este dat în principal de existența legăturilor de hidrogen între grupările NH şi CO ale aminoacizilor componenți. Un grup CO al unui aminoacid este legat prin legătură de hidrogen de un grup NH al altui aminoacid situat în secvența primară cu patru reziduuri (aminoacizi) înainte. Este important de menționat că aceste legături de hidrogen se stabilesc între toți aminoacizii grupării α-helix respective. Din punct de vedere topologic, distanța dintre oricare doi aminoacizi din structura unui α-helix, măsurată în lungul axei de simetrie longitudinale, este de 1,5 Å, iar numărul de aminoacizi pe fiecare 'perioadă' de repetiție a helix-ului (5,4 Å) este de 3,6. Sensul de 'rotație' al unui asemenea α-helix poate fi în sensul, respectiv invers sensului de rotație al acelor de ceasornic; din considerente încă neclare, natura a cauzat o rupere de simetrie în modul de constituire al proteinelor, în sensul că toate proteinele naturale şi funcționale au sensul de 'rotație' în sensul acelor de ceasornic. Conținutul de structuri α-helix al unei proteine este o mărime variabilă. Unele proteine (e.g., hemoglobina, mioglobina) sunt în cea mai mare parte constituite din asemenea structuri; altele (e.g., chimotripsina) nu conțin aproape deloc α-helix-uri.

Este remarcabil că structura tip 'α-helix' a fost dedusă teoretic de Pauling şi Corey cu 6 ani înainte ca ea să fie pusă în evidență experimental, din figurile de reconstrucție ale difracției razelor X pe mioglobină. Aceasta a constituit un mare succes al modelelor predictive în biologia moleculară; s-a dovedit că structura tri-dimensională a unei polipeptide poate fi intuită şi prezisă, dacă proprietățile fizice şi topologice ale elementelor sale constituente sunt pe deplin cunoscute.

În aceeaşi perioadă, Pauling şi Corey au descoperit şi alt model de organizare tri-dimensională a proteinelor cu proprietate de repetabilitate în structura acestora, denumit structură planară β ('β-sheet'). După cum ne sugerează şi numele, structura planară β se 'extinde' mai ales bi-dimensional (ca o foaie de hârtie); distanța între 2 aminoacizi vecini este de 3,5 Å iar caracterul de stabilitate tri-dimensională al acestei structuri este dat de existența legăturilor de hidrogen între grupări NH şi CO aparținând unor lanțuri polipeptidice adiacente (Fig. 5)

Lanțurile polipeptidice adiacente pot fi paralele (sunt extinse bi-dimensional în acelaşi sens) sau anti-paralele. Un exemplu de proteină constituită aproape în întregime din structuri planare de tip β este fibroina (mătasea naturală).

Cea de-a 3-a structură cu caracter de repetitivitate întâlnită în organizarea structurii secundare a proteinelor este colagenul. Studii de microscopie electronică şi hidrodinamică moleculară au arătat că la baza constituirii tri-dimensionale a colagenului stă o structură triplă de lanțuri polipeptidice elicoidale care (spre

deosebire de structura secundară de α-helix) nu sunt stabilizate prin legături de hidrogen dar interacționează între ele prin intermediul acestui tip de legături. Structura secundară tip colagen este foarte întâlnită în constituția colagenului, care este proteina esențială din oase, piele și tendoane.

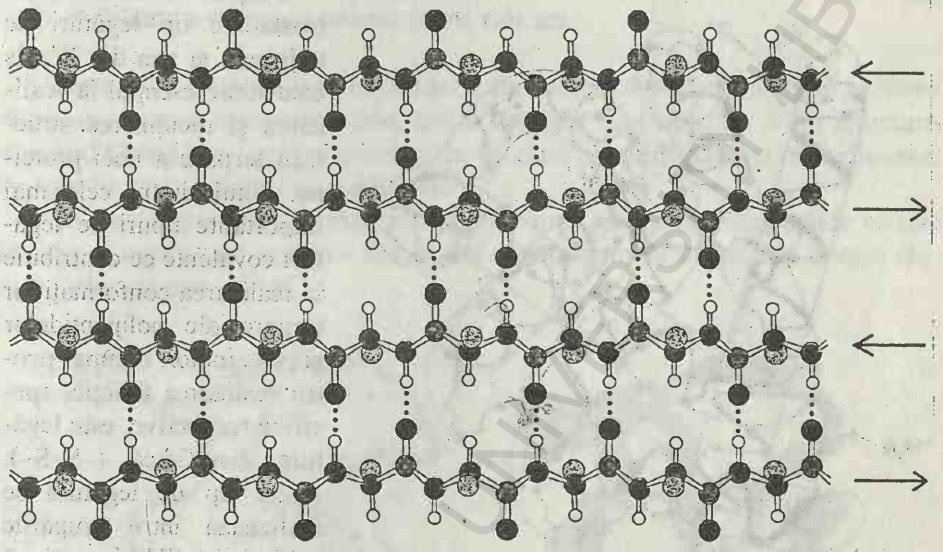


Fig. 5. Modelul spațial de structură geometrică secundară a unui domeniu peptidic de tip planar β (sau foaie pliata, *'β-sheet'*)

Trebuie menționat că structurile secundare prezentate pe scurt mai sus NU reprezintă TOATE modalitățile favorabile din punct de vedere energetic, pentru constituirea unei polipeptide. Este însă aparent (și remarcabil, totodată) că NATURA a ales să se "reprezinte" în structurile vii printr-un număr minim de conformații de structură secundară a polipeptidelor și proteinelor, care să posede caracter de universalitate pentru toate macromoleculele constituite din aminoacizi.

1.3. *Structura terțiară*

Modul de aranjare spațială a aminoacizilor dintr-o structură proteică, ce sunt situați la distanțe mari unii față de alții în structura sa primară, poartă numele de structură terțiară a proteinei. Cu toate că pentru anumiți cercetători diferența între structura secundară și cea terțiară este doar o chestiune de "gust", nu este

eronat să afirmăm că structura terțiară se referă la modul de "împachetare" spațială ("folding") a complexelor de structură secundară a unei proteine.

Pentru exemplificare, structura terțiară a unei proteine este prezentată mai jos:

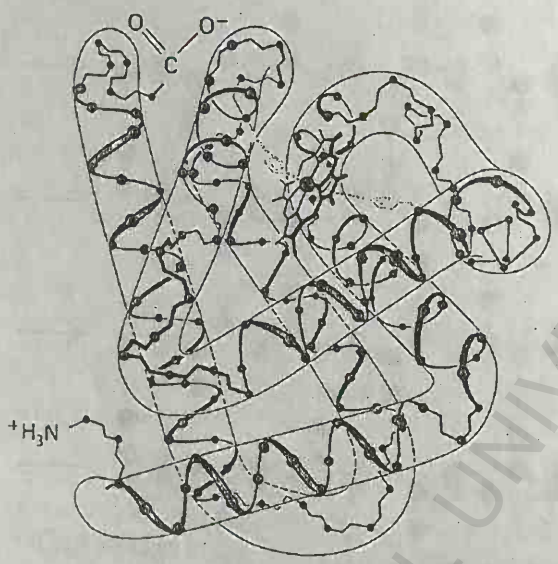


Fig. 6. Modelul de organizare proteică terțiară a mioglobinei [*Biochemistry (4th edition), 1995. Stryer, L.*]

Un exemplu particular de peptide în care legătura disulfidică este hotărâtoare pentru menținerea conformației terțiare active îl reprezintă clasa conopeptidelor (peptide izolate din specii de scoici de mare *Conus*). Prezența cu frecvență și topografie variabile a acestor legă-

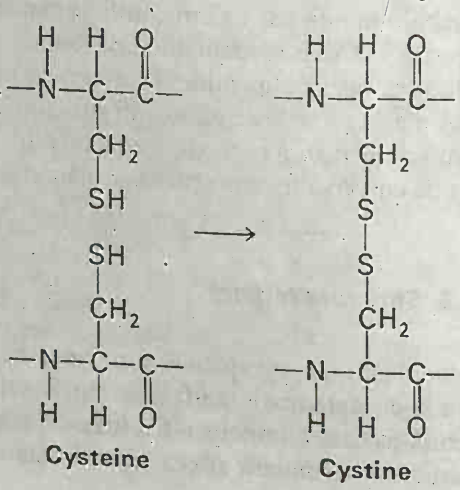


Fig. 7. Modul de formare a unei legături disulfidice (-S-S-) între grupările sulfhidril (-SH) a două reziduuri aminoacidice cistinice

Forțele covalente electrostatice, tip legături de hidrogen și van der Waals contribuie esențial la realizarea și menținerea structurii terțiare a unei proteine. Unul dintre cele mai importante tipuri de legături covalente ce contribuie la realizarea conformațiilor terțiare ale polipeptidelor și proteinelor, esențial pentru realizarea funcției specifice respective, este legătura disulfidică (–S–S–). Acest tip de legătură se realizează între grupările sulfhidril (–SH) de pe două reziduuri de cisteină, după cum este arătat mai jos:

BCU STATE UNIVERSITY LIBRARY

turi în structura conopeptidelor le înzestrează pe acestea cu două proprietăți esențiale:

a. structura terțiară ('folding') foarte bine definită și deci afinitate maximă doar pentru clase specifice de receptori celulari
b. stabilitate a structurii terțiare foarte ridicată

Aceste două proprietăți constitue actul fundamentul al farmacologiei *peptidomimetice*, în care asemenea conopeptide naturale sunt utilizate drept structuri-standard ('template') pentru dezvoltarea de clase de medicamente mai eficiente, cu specificitate și eficacitate superioare.

Mai jos este prezentată structura terțiară a unei asemenea conopeptide ce este în faza de omologare pentru a fi utilizată ca medicament în tratarea durerii cronice ('chronic pain-killer'):

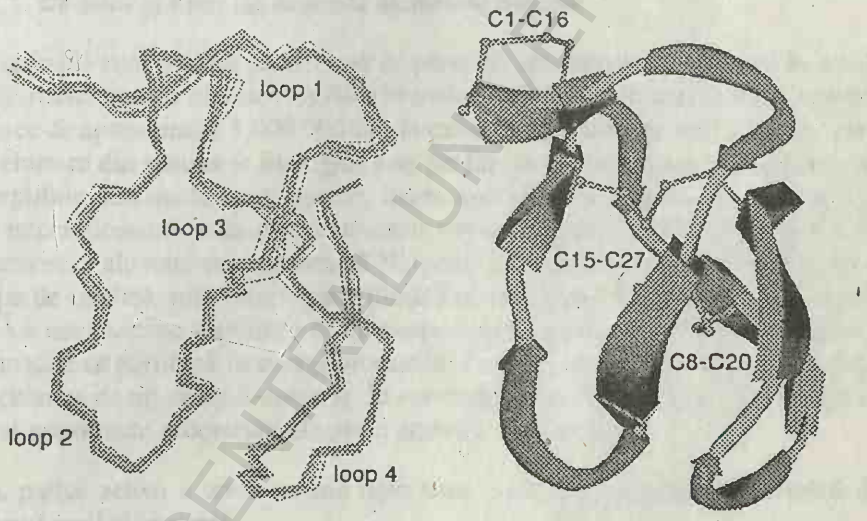


Fig. 8. Structura de aranjare spațială a unei conopeptide artificiale (CVID) utilizată curent în tratarea durerii cronice [*Lewis, R. J. et al, 2000. J. Biol. Chem. 275:45*]

Polipeptidele și proteinele reprezintă deci clase macromoleculare unice din punct de vedere al recunoașterii de substraturi de interacțiune specifice și al interacțiunii cu acestea. Aceste calități le sunt conferite de posibilitatea adoptării unor structuri terțiare complementare geometric cu substratul specific ('key-and-lock') și de existența la suprafața acestor structuri terțiare a unor grupări adiacente diferite (ce provin de la aminoacizii componenți) cu varietate largă în ceea

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

ce priveşte tipul de interacţiuni pe care le pot stabili cu acel substrat specific (legături de hidrogen, electrostatice, van der Waals). Mai mult, prin mecanisme de modificare post-translaţională a aminoacizilor componenţi ai unei proteine, tăria şi durata existenţei acestor interacţiuni sunt mărimi variabile şi controlate precis de procese celulare apărute evolutiv.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

2. Enzimele, catalizatori biologici

Pentru a înțelege câteva din cele mai importante mecanisme ale exercitării funcției unor proteine, va fi abordată în acest capitol o expunere comprehensiva a unei clase specifice de proteine, enzimele.

Chiar dacă prezentarea detaliată a acestor noțiuni poate fi mai degrabă pusă în sarcina unui tratat de biochimie, acest capitol încearcă sa fie o introducere esențială în acest subiect științific.

2.1. *Ce sunt şi cum îşi exercită enzimele funcția*

Enzimele sunt o clasă particulară de proteine specializate funcțional în cataliza diferitelor reacții chimice. Având în vedere că enzimele accelerează reacțiile chimice de aproximativ 1.000.000 ori, în cazul în care acestea sunt absente, reacțiile chimice din sistemele biologice s-ar desfăşura cu rate de reacție aproape imperceptibile. Enzimele sunt, aşadar, foarte specifice în alegerea reactantului cu care interacționează şi care este denumit substrat. Una din cele mai importante caracteristici ale unei enzime este că NU toată suprafața ei participă nemijlocit în reacția de cataliză, prin interacțiune directă cu substratul său specific. Partea ACTIVĂ a unei enzime (regiunea ce interacționează cu substratul) conține doar acei aminoacizi ce participă în cursul procesului de interacțiune în realizarea de legături chimice de tip enzimă-substrat. În continuare vor fi prezentate câteva din cele mai importante proprietăți ale părții active a unei enzime:

a. partea activă a unei enzime reprezintă, volumic, o parte relativ mică din volumul total al enzimei

b. partea activă a unei enzime este o structură tri-dimensională formată din aminoacizi ce provin din regiuni foarte diferite geometric, din structura primară a enzimei. De exemplu, în cazul lisozimei, cele mai importante grupări aminoacidice din partea activă sunt cei numerotați 35, 52, 62, 63 şi 101 din secvența liniară totală a enzimei (cu aminoacizi de la 1 la 129)

c. interacțiunile enzimă-substrat se realizează exclusiv prin intermediul unor legături multiple, slabe energetic. Astfel, cele mai importante tipuri de legături implicate şi care dau o energie relativă de legătură de ordinul 10 kcal/mol sunt:

BCU CLUJ "LUCIAN BLAGA" UNIVERSITY LIBRARY

legăturile van der Waals, legăturile de hidrogen şi interacţiuni hidrofobe. Pentru ca interacţiunile van der Waals să reprezinte energetic bariere semnificative de disociere, trebuie ca ele să se manifeste cu caracter multiplu. De aici rezultă proprietatea de necesitate a complementarităţii geometrice ('key-lock') între partea activă şi substrat. Pe de altă parte, datorită faptului că legăturile de hidrogen au puternic caracter direcţional (energia minimă a sistemului se realizează în cazul în care atomii implicaţi în acest tip de legături sunt coliniari), proprietatea de specificitate a interacţiunii substrat-parte activă apare ca o consecinţă naturală.

d. în cazul tuturor enzimelor studiate, partea activă se constituie ca o topologie de suprafeţe convexe. În acest fel, apa este exclusă din procesul de interacţiune parte activă – substrat. Datorită caracterului preponderent nepolar al părţii active cu topologie convexă, se asigură o energie de interacţiune mai mare a sistemului. Cu toate acestea, sunt cazuri în care partea activă a unei enzime conţine şi reziduuri polare, cu roluri şi proprietăţi speciale în procesul de interacţiune.

e. în anul 1890, Emil Fischer a asimilat topologia sistemului partea activă – substrat cu un mecanism 'cheie-broască' ('key-lock'). Astfel, el a subliniat necesitatea caracterului de complementaritate geometrică a părţii active şi respectiv a substratului (Fig. 9).

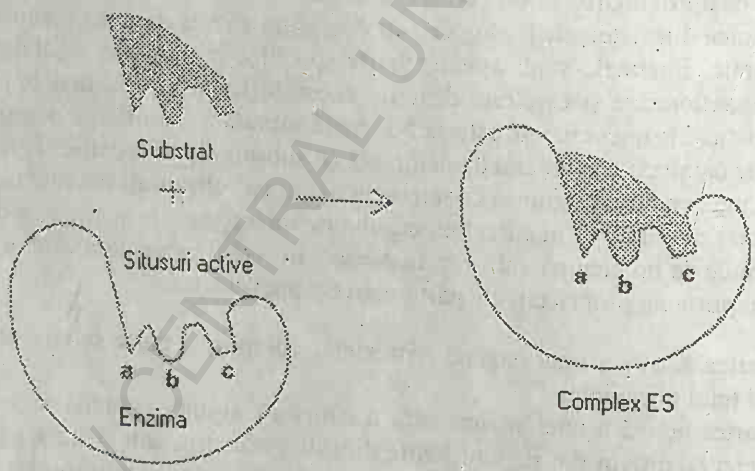


Fig. 9. Ilustrarea modelului *'key-lock'* de interacţiune moleculară între o moleculă substrat şi situsul activ al unei enzime

Este foarte util de amintit aici că, în ultimii ani, conceptul 'key-lock', care sugerează o conformaţie fixă, stabilă a moleculelor ce interacţionează, este înlocuit

cu un altul, 'hand in glove'; acesta din urmă este mai sugestiv, deoarece în cursul interacției între o moleculă substrat şi o enzimă, grupările chimice implicate în interacțiune îşi modifică progresiv şi continuu orientarea spațiala relativă, fapt ce este rezultat din natura mecanismului molecular de interacțiune.

Cu toate că enzimele, ca şi catalist, accelerează viteza unei anumite reacții, ele NU alterează constanta de echilibru a respectivei reacții. Aceasta înseamnă că, prin natura mecanismului ce stă la baza catalizei enzimatice, o enzimă modifică ratele de tranziție ale unei reacții (de formare 'on' şi de disociere 'off' a unui produs) cu exact acelaşi factor. Pentru exemplificare, putem considera următoarea reacție:

$$A \underset{k_{off}}{\overset{k_{on}}{\Leftrightarrow}} B \qquad (2.1)$$

pentru care ratele de formare şi de disociere au valorile $k_{on}=10^{-4}\ s^{-1}$, $k_{off}=10^{-6}\ s^{-1}$.

În acest caz, constanta de echilibru a reacției de mai sus este definită prin:

$$K = \frac{[B]}{[A]} = \frac{k_{on}}{k_{off}} = 100 \qquad (2.2)$$

În conformitate cu expresia de mai sus, valoarea concentrației de echilibru a compusului B va fi de 100 de ori mai mare decât a compusului A, indiferent de prezența sau absența unei enzime care să catalizeze această reacție; cu toate acestea, **timpul** în care acest echilibru este atins este mai mult de o oră în absența unei enzime şi poate căpăta valori de ordinul sutelor de milisecunde în absența unei enzime.

Pentru a explica mecanismul prin care o enzimă îşi exercită funcția catalitică, un rol important îl joacă modelul folosit pentru a vizualiza desfăşurarea unei reacții în care substratul (S) se transformă în produsul (P):

$$\underset{substrat}{S} \overset{K^{\neq}}{\Leftrightarrow} \underset{tranzitie}{S^{\neq}} \overset{v}{\Rightarrow} \underset{produs}{P} \qquad (2.3)$$

Conform acestui model, care se mai numeşte şi 'teoria complexului activat', substratul (S) trece mai întâi în cursul reacției printr-o stare de tranziție ($S^{\neq}$), cu energia liberă a acestei stări mai mare decit a substratului sau produsului (P).

Energia liberă de tranziție între starea S şi starea de tranziție $S^{\neq}$ se numeşte energie liberă de activare, şi este numeric egală cu diferența între energiile libere corespunzătoare celor două stări.

$$\Delta G^{\neq} = G_{S^{\neq}} - G_S \qquad (2.4)$$

BCU CLUJ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

În expresia de mai sus şi în cele ce urmează, dacă nu este specificat contrariul, notaţia energiei libere se referă la energia liberă molară.

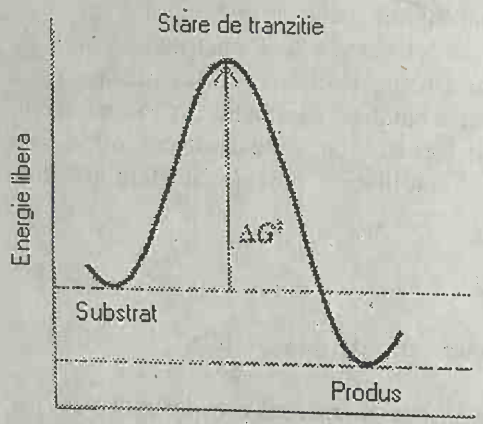


Fig. 10. Diagrama energetică a stărilor moleculare ce constituie reacţia de transformare a moleculelor de substrat în molecule tip produs, cu evidenţierea stării intermediarede tranziţie

Viteza de reacţie (v) a procesului de transformare stare de tranziţie ($S^{\neq}$)–produs (P) este direct proporţională cu concentraţia de compus în starea de tranziţie [$S^{\neq}$] care, ţinând cont de echilibrul între stările S şi $S^{\neq}$, depinde de energia liberă de activare prin expresia:

$$[S^{\neq}] = [S]e^{\frac{-\Delta G^{\neq}}{RT}} \qquad (2.5)$$

Deci, viteza de reacţie a transformării $S^{\neq}$- P este dată de expresia:

$$v = \frac{kT}{h}[S]e^{\frac{-\Delta G^{\neq}}{RT}} \qquad (2.6)$$

unde: [S] este concentraţia de substrat, k este constanta lui Boltzmann, h este constanta lui Planck, T este temperatura absolută a mediului în care are loc reacţia iar R este constanta generală a gazelor.

Referindu-ne la acest exemplu, enzimele îşi exercită funcţia de cataliză a reacţiei substrat (S)–produs (P) prin **micşorarea** valorii energiei libere de activare ($\Delta G^{\neq}$).

Interacţiunea între enzimă şi substrat conduce, prin legăturile chimice slabe ce concură la formarea

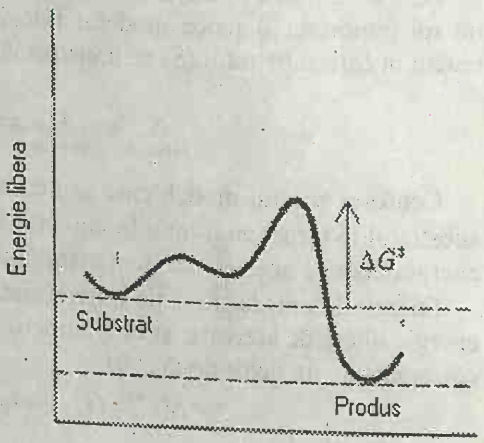


Fig. 11. Exemplificarea mecanismului prin care o enzimă produce cataliza reacţiei de transformare a moleculelor substrat în molecule produs

BCU "SPIRU HARET" UNIVERSITY LIBRARY

complexului enzimă–substrat, la generarea de noi stări de tranziție prin care reacția S–P poate avea loc, cu energii de activare ale stărilor noi de tranziție mult mai mici.

După cum a fost subliniat mai sus, un intermediar esențial în explicarea catalizei enzimatice este compusul 'enzimă–substrat'. Enzimele sunt astfel selective doar pentru cataliza unor reacții specifice prin interacțiunea lor selectivă cu un anumit substrat şi care să rezulte într-un complex unic 'enzimă–substrat'. Existența complexului 'enzimă – substrat' a fost pusă în evidență experimental; de exemplu, experimente de microscopie electronică au permis vizualizarea directă a ADN-polimerazei I legată pe substrat de ADN. Suplimentar, experimente de spectroscopie (e.g., rezonanța magnetică nucleară, rezonanța electronică de spin) au adus argumente în plus pentru existența structurală a complexului 'enzimă–substrat' în procesul catalizei enzimatice.

2.2. *Modelul Michaelis-Menten pentru descrierea proprietăților cinetice ale enzimelor*

Pentru cele mai multe dintre enzime, viteza (rata) de cataliză nu este constantă, ci variază cu concentrația substratului [S]:

Un model consistent care să explice această dependență a fost dat de către Leonor Michaelis şi Maud Menten încă din anul 1913. Un element esențial al modelului lor l-a constituit existența complexului intermediar enzimă-susbstrat. Astfel, o reacție catalizată simplă este reprezentată astfel:

$$E(enzima) + S(substrat) \underset{k_2}{\overset{k_1}{\Leftrightarrow}} ES \overset{k_3}{\Rightarrow} E + P(produs) \qquad (2.7)$$

Reamintim că problema de analizat este determinarea unei expresii cantitative care să conțină valoarea ratei de cataliză în funcție de concentrația substratului, a enzimei şi a ratelor de reacție individuale (cum au fost expuse în reacția de mai sus).

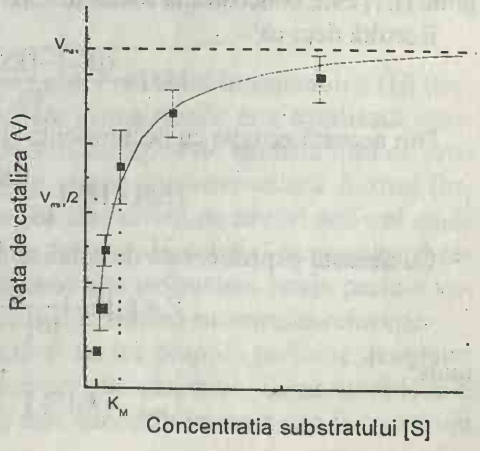


Fig. 12. Reprezentarea grafică a dependenței experimentale a vitezei de reacție (V) de concentrația substratului ([S]), pentru o enzimă a cărei proprietăți cinetice de reacție sunt descrise de modelul lui Michaelis şi Menten [*Luchian, T. 1997., Ph. D. Thesis, Graz*]

BCU CLUJ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Prin definiție, rata de cataliză este dată de:

$$V = k_3[ES] \tag{2.8}$$

Ratele de formare şi descompunere a complexului 'enzimă–substrat' (ES) sunt date de:

$$\begin{aligned} V_{formare}\{ES\} &= k_1[E][S] \\ V_{descompunere}\{ES\} &= (k_2 + k_3)[ES] \end{aligned} \tag{2.9}$$

În condiții de staționaritate, condiții în care a fost trasată curba 'răspuns-doză' din figura 12, ratele de formare şi descompunere ale complexului (ES) sunt egale:

$$k_1[E][S] = (k_2 + k_3)[ES] \tag{2.10}$$

Utilizând notația:

$$K_M = \frac{k_2 + k_3}{k_1} \text{ (constanta lui Michaelis)} \tag{2.11}$$

rezultă:

$$[ES] = \frac{[E][S]}{K_M} \tag{2.12}$$

În condițiile în care concentrația enzimei este mult mai mică decât cea a substratului ([E] << [S]), concentrația substratului necombinat cu enzima în cursul reacției este aproximativ egală cu concentrația totală a substratului ([S]). În aceste condiții, concentrația de enzimă ce nu a rămas necombinată cu substratul este dată de expresia:

$$[E] = [E_T] - [ES] \tag{2.13}$$

unde $[E_T]$ este concentrația totală de enzima utilizată.

Rezultă deci că:

$$[ES] = \frac{([E_T] - [ES])([S])}{K_M} \tag{2.14}$$

Din această ecuație cu necunoscuta ([ES]), rezultă imediat:

$$[ES] = [E_T]\frac{[S]}{[S] + K_M} \tag{2.15}$$

Cu această expresie, rata de cataliză devine:

$$V = k_3[E_T]\frac{[S]}{[S] + K_M} \tag{2.16}$$

unde:

$$V_{max.} = k_3[E_T] \text{ (rata maximă de cataliză)} \tag{2.17}$$

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Relația Michaelis-Menten care descrie foarte bine experimentul sugerat de Fig. 12 este deci:

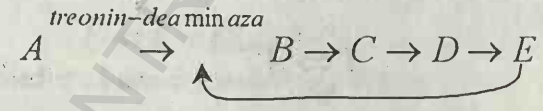
$$V = V_{max.} \frac{[S]}{[S] + K_M} \qquad (2.18)$$

La concentrații mici ale substratului, ([S] << K_M), rata de cataliză este direct proporțională cu concentrația de substrat; la concentrații mari de substrat, rata de cataliză devine maximă şi *independentă* de concentrația substratului. De asemenea, din formula de mai sus rezultă că semnificația constantei lui Michaelis (K_M) este cea de concentrație de substrat pentru care rata de cataliză devine egală cu jumătate din rata maximă de cataliză.

2.3. *Mecanisme de reglare a funcțiilor enzimelor*

Odată cu apariția şi evoluția enzimelor, ca sisteme proteice supra-moleculare cu înaltă specificitate şi eficacitate în cataliza anumitor reacții chimice în sistemele vii, în procesul de evoluție al sistemelor proteice natura a trebuit să caute soluții pentru găsirea unor mecanisme de control a activității enzimelor. Cele mai importante mecanisme de reglare a activității enzimatice sunt:

a. Inhibiția 'feed-back' – Natura acestui mecanism este de inhibiție a primei reacții de biosinteză, catalizată enzimatic, dintr-o serie de reacții, de către ultimul produs al seriei de reacții. Un exemplu în acest sens îl constituie biosinteza bacterială a isoleucinei din treonina.



Cum se sugerează mai sus, treonina (A) este convertită în isoleucina (E) prin intermediul a patru reacții succesive, din care prima reacție este catalizată enzimatic de treonin-deaminasă. Activitatea acestei enzime este inhibată însă de produsul final (isoleucina), când concentrația sa atinge o valoare critică. Situsul (locul) de interacțiune între isoleucina şi enzima este diferit de situsul activ al enzimei, şi spunem în acest caz că substratul de acțiune al inhibiției enzimatice îl reprezintă interacțiunile alosterice. Când concentrația isoleucinei scade peste o valoare de prag, treonin-deaminaza devine activă şi sinteza isoleucinei reîncepe.

b. Activitatea enzimelor este controlată şi de un grup de proteine denumite proteine regulatoare. Proteinele regulatoare pot, fie să inhibe, fie să stimuleze o anumită reacție enzimatică. Exemplul cel mai cunoscut în acest caz îl constituie

calmodulina; legarea a patru ioni de calciu pe această proteină (17 kDa) eucariota induce formarea unor domenii tip α–helix în structura sa precum şi alte schimbări de conformaţie terţiară. Aceasta conduce la conversia calmodulinei din starea inactivă în stare activă, ce poate interacţiona astfel cu diferite enzime eucariote, modificându-le activitatea.

c. Un alt mecanism important de modificare a activităţii enzimatice îl constituie modificarea covalentă a enzimelor implicate în procesul de cataliză. Astfel, fosforilarea reziduurilor serină, treonină şi tirozină (ataşarea unei grupări fosforil pe aceşti aminoacizi) conduce la modificarea dramatică a activităţii enzimelor astfel modificate covalent. Pentru a înţelege în detalii acest mecanism, vom considera exemplul unei proteine ce poate adopta două conformaţii alosterice: inactivă (cu energie minimă–I) şi activă (cu energie superioară–A). Diferenţa energetică între cele două stări favorizează prezenţa proteinei în starea inactivă, conform schemei de mai jos:

$$I \underset{k_{A-I}}{\overset{k_{I-A}}{\Leftrightarrow}} A \qquad (2.19)$$

unde k_{I-A}, k_{A-I} reprezintă ratele de tranziţie între stările 'I'–'A' respectiv 'A'–'I' ($k_{I-A} << k_{A-I}$).

În acest exemplu, proteina se va afla cel mai probabil în starea inactivă. Una din metodele dezvoltate evolutiv pentru a favoriza tranziţia proteinei în starea activă este (după cum subliniam şi mai sus) transferul unui grup fosfat de la molecula de ATP pe un residuu aminoacidic specific, cu care interacţionează covalent; vezi schema de reacţie de mai jos:

$$I \underset{k^*_{A-I}}{\overset{k^*_{I-A}}{\Leftrightarrow}} A^{P--} \qquad (2.20)$$

Datorită prezenţei sarcinii nete negative pe grupul fosfat ataşat, aceasta va induce schimbări conformaţionale în proteină datorită interacţiunilor electrostatice între el şi regiuni încărcate electric de pe proteină. În cazul în care aceste interacţiuni electrostatice stabilizează proteina în starea 'activă', rata de tranziţie din starea inactivă (I) spre starea activă (A) va fi mai mare decât pentru reacţia inversă ($k^*_{I-A} >> k^*_{A-I}$).

Mecanismele de inhibiţie a activităţii enzimatice de către ioni şi alte molecule reprezintă mecanisme principale de control în sistemele biologice. Inhibiţia enzimatică poate fi reversibilă sau ireversibilă; în cazul ireversibilităţii inhibiţiei, molecula-inhibitor interacţionează foarte puternic (în special prin legături covalente) cu enzima, având astfel o rată de disociere foarte scăzută.

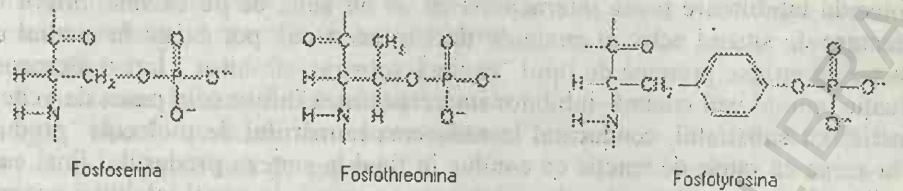


Fig. 13. Reprezentarea fosforilată a aminoacizilor serină, threonină și tyrosină

Din punct de vedere al mecanismului de acțiune al inhibitorilor, distingem două procese de inhibiție:

a. **Inhibiția competitivă** – în acest caz, moleculele inhibitoare competitive interacționează nemijlocit cu situsul activ al enzimei, datorită faptului că structura terțiară a inhibitorului este foarte asemănătoare topologic cu substratul ce interacționează cu enzima; astfel, moleculele de substrat sunt excluse de la interacțiunea cu enzima. Un inhibitor competitiv diminuează rata de cataliză prin aceea că reduce numărul de molecule de enzimă ce rămân disponibile pentru interacțiunea cu substratul-țintă. În acest caz, rata maximă de cataliză (V_{max}) este neafectată de prezența inhibitorului, iar constanta lui Michaelis (K_M) crește.

Pentru o schemă de reacție a unei enzime (E) cu substratul (S) în prezența inhibitorului competitiv (I) de forma:

$$EI \overset{+I}{\Leftrightarrow} E \overset{+S}{\Leftrightarrow} ES \Rightarrow E + P \qquad (2.21)$$

se poate verifica imediat că rata de cataliză este dată de:

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_M}{V_{\max}}\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)\left(\frac{1}{[S]}\right) \qquad (2.22)$$

unde K_i este constanta de disociere a complexului enzimă-inhibitor:

$$E + I \underset{k_{off}}{\overset{k_{on}}{\Leftrightarrow}} EI$$

$$K_i = \frac{k_{off}}{k_{on}} = \frac{[EI]}{[E][I]} \qquad (2.23)$$

Un mod simplu de a reduce efectele inhibiției competitive este de a mări concentrația moleculelor substratului.

BCU IASI / CENTRUL DE CERCETARE

b. **Inhibiția necompetitivă** – caracteristic acestui mecanism este faptul că molecula inhibitoare poate interacționa cu un alt situs de pe enzimă, diferit ca orientare de situsul activ al enzimei; deci în acest caz pot exista în mediul de reacție complexe proteice de tipul 'enzimă–substrat–inhibitor'. Într-o asemenea situație, complexul enzimă–inhibitor interacționează diferit (din punct de vedere cinetic) cu substratul, conducând la reducerea numărului de molecule 'produs' prin aceea că ratele de reacție ce conduc în final la sinteza produsului final sunt modificate de prezența moleculei-inhibitor pe enzimă. În cazul inhibiției necompetitive valoarea constantei lui Michaelis (K_M) rămâne nemodificată, pe când rata maximă de cataliză (V_{max}) este diminuată.

Schema generală a unei reacții între o enzimă (E), substratul (S) şi inhibitorul necompetitiv (I) este surprinsă de ecuațiile cinetice cuplate:

$$E \overset{+S}{\Leftrightarrow} ES \Rightarrow E + P$$
$$E \overset{+I}{\Leftrightarrow} EI \overset{+S}{\Leftrightarrow} ESI \overset{+I}{\Leftrightarrow} I + ES \qquad (2.24)$$

Se poate deduce astfel ca rata maximă de cataliză în prezența unui inhibitor necompetitiv (V^I_{max}) este dată de expresia:

$$V^i_{max} = \frac{V_{max}}{1 + \frac{[I]}{K_i}} \qquad (2.25)$$

În figura de mai jos este arătată sugestiv diferența între modul de acțiune al inhibitorilor enzimatici competitivi şi necompetitivi.

O clasă specială de enzime, ale căror proprietăți cinetice nu pot fi descrise în cadrul modelului Michaelis–Menten, sunt enzimele alosterice. Enzimele alosterice sunt caracterizate prin două proprietăți fundamentale:

a. există mai multe situsuri (domenii topologice) active în structura enzimei;

b. situsurile active din structura enzimei **nu** sunt independente unele în raport cu altele.

Pentru a ajuta înțelegerea mecanismul de activitate al unei enzime alosterice, să considerăm următoarea schemă de reacție pentru interacțiunea dintre o asemenea enzimă (E) şi substrat (S):

$$E_0 + S \Leftrightarrow E_1$$
$$E_1 + S \Leftrightarrow E_2$$
$$\cdots\cdots\cdots\cdots$$
$$\cdots\cdots\cdots\cdots \qquad (2.26)$$
$$E_{n-1} + S \Leftrightarrow E_{n-1}$$

BCU IAŞI ... UNIVERSITY LIBRARY

unde E_0, E_1, ..E_{n-1} se referă la molecule de enzimă (cu n situsuri active) înainte de interacțiunea cu substratul specific (E_0), cu un situs ocupat (E_1) etc.

Considerăm în continuare că variația de energie liberă asociată cu interacțiunea ($E_0 + S \Leftrightarrow M_1$) este dată de expresia:

$$\Delta G_0^0 = -RT \ln k_0 \quad (2.27)$$

unde k_0 este constanta microscopică de disociere a unei molecule de ligand (substrat) de pe primul situs activ al enzimei, R este constanta generală a gazelor iar T reprezintă temperatura absolută la care are loc interacțiunea studiată.

Deducerea relației de mai sus poate fi făcută utilizând noțiunile introduse în cadrul 'teoriei complexului activat', mai sus amintite.

Datorită proceselor de transmitere în structura proteinei a deformațiilor locale produse la intercțiunea substrat – situs, ce conduce la fenomene de interacțiuni energetice între situsurile active ale acesteia, variația de energie liberă ce este asociată cu interacțiunile ulterioare cu molecule de substrat ale enzimei sunt diferite în funcție de gradul de ocupare al situsurilor active. Cu alte cuvinte, constanta de disociere a primei molecule de ligand (sau substrat) cînd enzima era 'goală', va fi diferită de constanta de disociere a celei de-a doua, a treia etc. molecule de ligand şi aceasta se datorează existenței interacțiunilor energetice între situsuri, descrise mai sus.

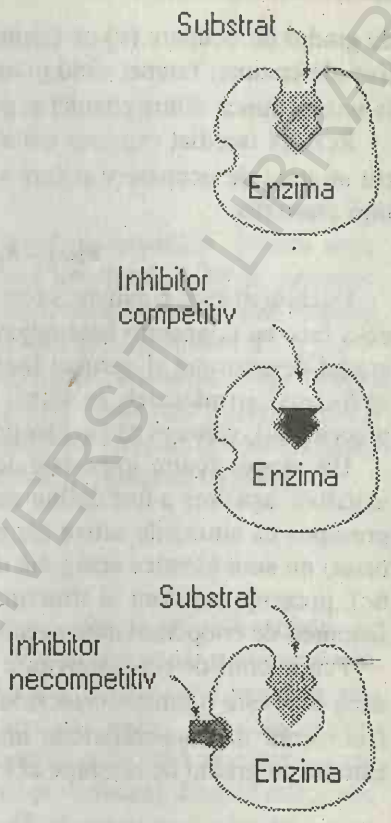


Fig. 14. Reprezentarea pictorială a mecanismelor de acțiune competitivă şi necompetitivă pentru inhibitorii enzimatici

Notând prin ν numărul de moli de substrat legat per mol de enzimă (grad de ocupare al enzimei), putem scrie:

$$\Delta G^0 = \Delta G_0^0 + RT\phi(\upsilon) \quad (2.28)$$

unde ΔG^0 este variația de energie liberă asociată cu disocierea unei molecule de ligand de pe o enzimă cu grad de ocupare ν, iar $\phi(\nu)$ este o funcție dependentă

BCU IAŞI - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

de gradul de ocupare (ν) ce cuantifică energetic interacțiunile între situsurile active ale enzimei (atunci când gradul de ocupare al enzimei este zero – ne referim la interacțiunea dintre enzimă şi prima moleculă de ligand - $\phi(\nu)=0$).

Rezultă imediat expresia constantei de disociere a ligandului de enzimă pentru un grad de ocupare ν şi care surprinde esența fenomenologică a cooperativității alosterice:

$$k(\upsilon) = k_0 e^{-\phi(\upsilon)} \tag{2.29}$$

Dacă $\phi(\nu)$ este o funcție crescătoare cu gradul de saturație al enzimei, avem de-a face cu cooperativitate negativă; dacă $\phi(\nu)$ este o funcție descrescătoare cu gradul de saturație al enzimei (adică, pe măsură ce situsurile active de pe enzimă se 'ocupă', următoarele molecule de substrat sunt legate mai puternic decât cele precedente), spunem că enzima prezintă cooperativitate pozitivă.

Un aspect foarte important legat de prezența procesului de cooperativitate negativă, aşa cum a fost definit mai sus, este următorul: în shema de mai sus, s-a presupus că situsurile active ale enzimei sunt identice energetic. Dacă aceste situsuri nu sunt identice energetic dar independente (fără să interacționeze energetic), prezența acestora în structura enzimei poate fi confundată cu prezența unui fenomen de cooperativitate negativă enzimatică.

Fenomenul de cooperativitate pozitivă, aşa cum este definit în context, apare dacă $\phi(\nu)$ este o funcție crescătoare cu gradul de saturație al enzimei. Alternativ, fenomenul de cooperativitate negativă apare dacă $\phi(\nu)$ este o funcție descrescătoare cu gradul de saturație al enzimei.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

3. Funcția biologică a acizilor nucleici

Acidul deoxiribonucleic (ADN) reprezintă 'molecula eredității' pentru toate celulele procariote și eucariote. Din punct de vedere structural, ADN-ul este constituit din unități de structură numite deoxiribonucleotide, fiecare fiind formată dintr-o moleculă specifică (bază), o moleculă de zahăr și un grup fosfat.

Moleculele-bază ale ADN-ului sunt cele care susțin transmisia informației genetice, iar moleculele de zahăr și cele fosfat au doar roluri structurale în configurația macromoleculei de ADN. Există unele specii de virusuri ce utilizează ca material genetic o altă macromoleculă, denumită acid ribonucleic (ARN).

3.1. *Structura acizilor nucleici*

ADN-ul este un polimer ale cărui unități structurale se cheamă unități de deoxiribonucleotide, compuse la rândul lor dintr-o bază nitrogenă, o moleculă de zahăr și una sau mai multe grupări fosfat. Molecula de zahăr din componenta deoxiribonucleotidelor se numeste deoxiriboză (prefixul 'deoxi' se referă la faptul că această moleculă de zahăr nu are în componența sa atomul de oxigen, care se găsește în structura moleculei din care este derivat – riboza). Bazele nitrogene sunt derivați ai purinei, respectiv pirimidinei; bazele purinice sunt adenina (A) și guanina (G) iar bazele pirimidinice sunt timina (T) și citozina (C).

Mai jos sunt prezentate detaliat formulele chimice ale bazelor și moleculei de zahăr din componența deoxiribonucleotidelor.

Compusul rezultat în urma reacției între o bază purinică sau pirimidinică cu o moleculă de zahăr se numește nucleosidă. Astfel, în structura ADN-ului, se întâlnesc patru unitați nucleosidice, numite: deoxiadenosina, deoxiguanosina, deoxitimidina și deoxicitidina. În continuare, în urma reacției de esterificare între o nucleosidă și o moleculă fosfat rezultă unitatea structurală de bază a macromoleculei de ADN, denumită nucleotidă. Deoarece reacția de esterificare a nucleosidelor are loc la gruparea hidroxil ce se atașează cu carbonul C-5 de pe molecula de zahăr, compusul rezultat se numește nucleoside 5-fosfat (sau 5`-nucleotidă).

Ca entitate supramoleculară, ADN-ul este alcătuit din nucleotide ce interacționează între ele prin intermediul grupărilor fosfat; i.e., gruparea 3`-hidroxil a moleculei de zahăr a unei nucleotide se leagă de gruparea 5`-hidroxil a molecu-

lei de zahăr de pe nucleotida adiacentă printr-o legătură fosfodiesterică. În acest fel, unitatea structurală variabilă din componenţa macromoleculei de ADN este doar una din bazele purinice sau pirimidinice.

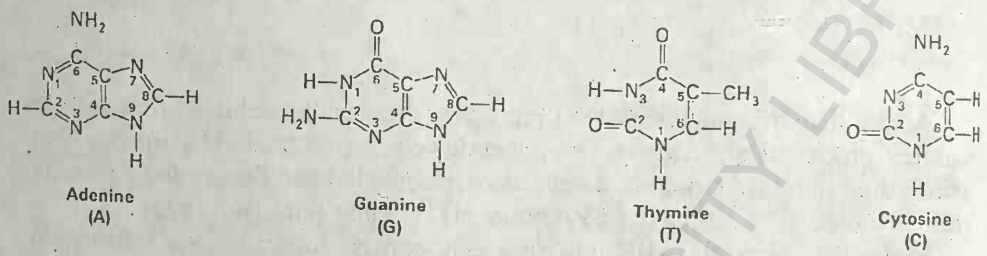


Fig. 15. Reprezentarea planară a structurii moleculare a moleculei de zahăr (deoxiriboza) şi a celor patru baze (A, G, T, C) ce intră în compoziţia acizilor nucleici [*Biochemistry (4th edition), 1995. Stryer, L.*]

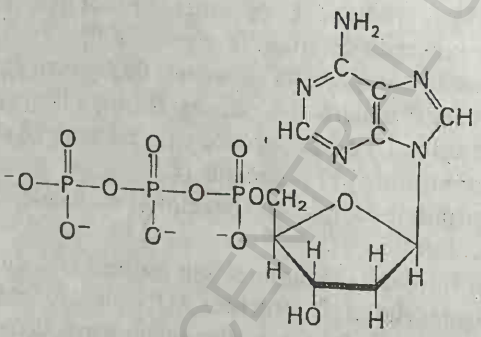


Fig. 16. Reprezentarea structurii moleculare a unei nucleoside 5-fosfat (deoxiadenosina 5'-trifosfat) [*Biochemistry (4th edition), 1995. Stryer, L.*]

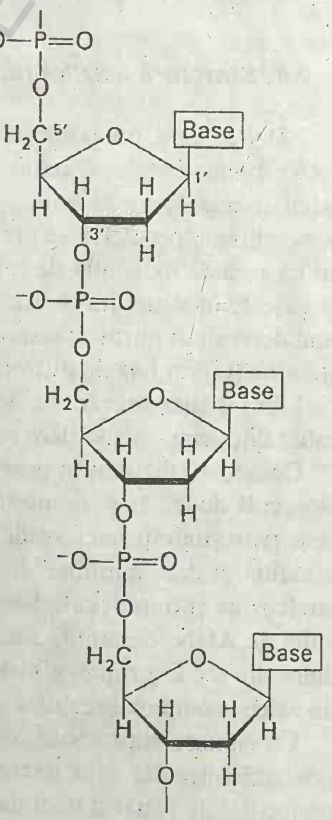


Fig. 17. Structura chimică simplificată a unei porţiunui dintr-un lanţ al macromoleculei de ADN [*Biochemistry (4th edition), 1995. Stryer, L.*]

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

3.2. *Organizarea ADN-ului în celulă*

În anul 1953, în urma analizei de reconstrucție a imaginii diagramelor de difracție cu raze X realizate pe fibre de ADN, James Watson și Francis Crick au dedus structura tri-dimensională a macromoleculei de ADN și mecanismul de replicare al acesteia. Aceasta a fost una din cele mai importante descoperiri din istoria biologiei moleculare, deoarece a condus la înțelegerea funcționării genelor în termeni moleculari. Cele mai importante caracteristici ale aranjării tridimensionale a moleculei de ADN, așa cum au fost deduse din experimentele lui Watson și Crick, sunt următoarele:

a. ADN-ul este organizat secundar și terțiar din două lanțuri polinucleotidice (constituite în secvența primară prezentată mai sus) cu forma de helix, ce se 'rotesc' în jurul unei axe comune și au sensuri de rotație opuse;

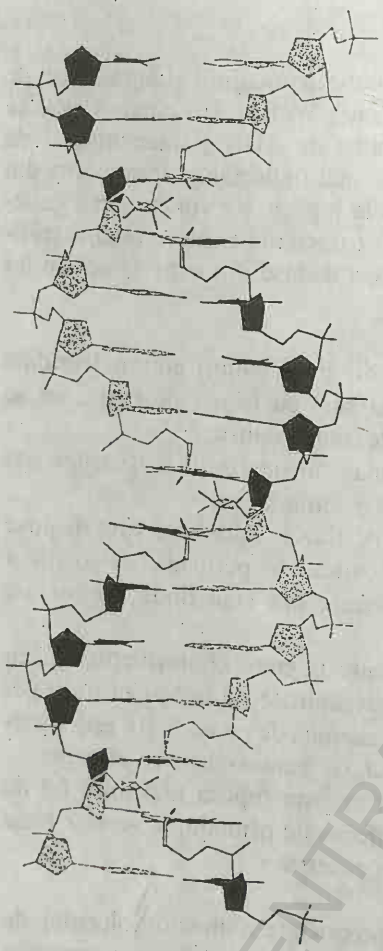
b. Bazele purinice și pirimidinice sunt aranjate în interiorul helixurilor, iar grupările de zahăr, respectiv fosfat, în exteriorul macromoleculei;

c. Diametrul moleculei de ADN este de 20 Å. Bazele adiacente sunt dispuse la o distanță de 3.4 Å una de alta în lungul helix-ului, iar 'perioada' de rotație a helix-ului este de zece baze (numărate pe oricare din cele două lanțuri ale macromoleculei de ADN – deci 34 Å)

d. Cele două lanțuri elicoidale sunt menținute în stare conformațională cu energie minimă (dublu-helix) prin intermediul legăturilor de hidrogen între perechi de baze 'paralele' de pe cele două lanțuri; adenina de pe un helix este întotdeauna conjugată pe celălalt helix doar cu timina, iar guanina doar cu citozina;

e. Secvența bazelor pe oricare din helix-uri nu este supusă nici unui fel de restricții. Aranjarea precisă, într-o anumită conformație primară, a acestor baze reprezintă tocmai esența transmiterii informației genetice.

Trebuie subliniat că cea mai importantă proprietate a macromoleculei de ADN, care stă și la baza replicării informației genetice, este conjugarea precisă a bazelor de pe cele două helix-uri (A – T și G – C). Există două motivații fizice ale acestei proprietăți: restricții sterice și oportunitatea formării unui număr maxim de legături de hidrogen. Restricțiile sterice sunt dictate de natura de helix a fiecărui lanț polipeptidic; legăturile glicoșidice (cele dintre molecula de zahăr și bază) 'atașate' unei perechi de baze conjugate sunt întotdeauna la o distanță de 10.85 Å. O pereche de baze purina-pirimidina se încadrează optim în acest spațiu; două baze purinice nu a-r încăpea steric, iar chiar dacă două baze pirimidinice ar avea suficient spațiu, ar fi la o distanță prea mare una față de cealaltă pentru formarea legăturilor de hidrogen între ele.



Atomii de hidrogen din bazele purinice şi pirimidinice au poziţii definite precis; astfel, adenina nu se poate asocia (conjuga) cu citozina, deoarece aceasta ar presupune localizarea a doi atomi de hidrogen (de pe citozină) lângă o legătură de hidrogen formată între ele, şi nu va rămâne nici un atom de hidrogen disponibil (pe citozină) pentru a constitui o altă legătură de hidrogen (cu oxigenul de pe adenină). Din considerente asemănătoare, guanina nu se poate conjuga cu timina. Configuraţia de cuplare între baze, aflate pe cele două helix-uri, care să ofere deci orientare şi distanţe optime ale legăturilor de hidrogen formate între ele sunt A – T şi G – C (Fig. 19).

Moleculele de ADN sunt foarte lungi; de exemplu, cromozomul bacteriei *E. Coli* (care este constituit dintr-o singură moleculă de ADN) conţine 4 miliarde de baze, iar masa sa este de 2.6×10^6 kDa. În ceea ce priveşte topologia sa, această moleculă de ADN are lungimea de 14×10^6 Å (dimensiune macroscopică – 1.4 mm) şi diametrul de doar 20 Å.

Fig. 18. Reprezentarea moleculară topologică terţiară, simplificată, a unei macromolecule de ADN

Din acest motiv, moleculele de ADN trebuie manipulate cu foarte mare grijă, întrucât forţe hidrodinamice relativ mici produc cu uşurinţă ruperea moleculei.

În general, experienţe de microscopie electronică au arătat că moleculele de ADN sunt aranjate spaţial sub formă circulară (această noţiune trebuie înţeleasă în termeni de continuitate a lanţului de ADN şi în sens strict geometric). Cu toate acestea, există anumiţi viruşi (bacteriofagul T7) în care molecula de ADN are topologie strict liniară. Alţi viruşi (bacteriofagi λ) induc alternanţă topologiei ADN-ului propriu: este sub formă liniară în interiorul virusului şi adoptă formă circulară în celula infestată.

BCU CENTRAL UNIVERSITARY LIBRARY

În toate celulele eucariote şi procariote, informaţia genetică este cuprinsă în molecula de ADN. În viruşi însă, informaţia genetică este stocată fie in molecule de ADN, fie de ARN.

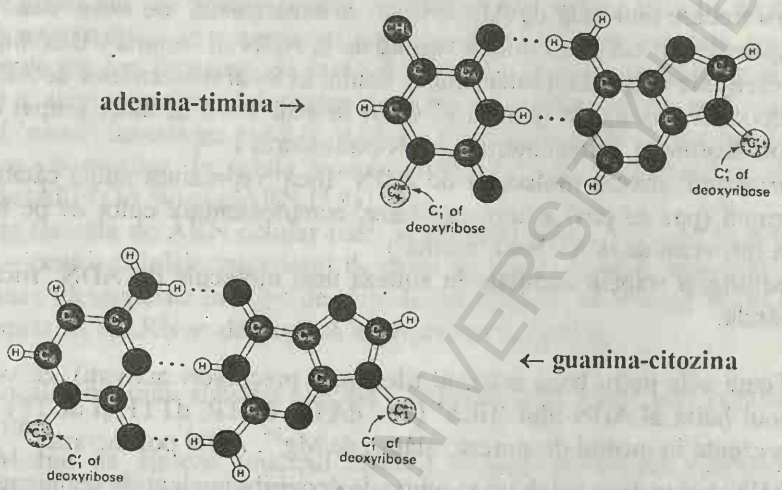


Fig. 19. Configuraţia geometrică de cuplare moleculară prin legături de hidrogen între cele patru baze din structura ADN

ARN-ul este tot o macromoleculă constituită din nucleotide legate prin interacţiuni fosfodiesterice, însă cu trei diferenţe majore faţă de molecula de ADN:

a. Spre deosebire de ADN, în ARN molecula de zahăr este riboza

b. În ceea ce priveşte conţinutul de baze, în ARN molecula de uracil (U) înlocuieşte molecula de timină (T) (uracilul este asemănător structural cu timina, dar nu are grupul metil)

c. Macromolecula de ARN poate exista fie în formă de dublu helix (ca şi ADN-ul), fie uni-helix

3.3. *Principiile replicării ADN-ului*

Replicarea ('self-sinteza') ADN-ului este un proces foarte complex ce implică interacţiunea coordonată a mai mult de 20 de enzime. Watson şi Crick au

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

propus că procesul de replicare este inițiat prin ruperea legăturilor de hidrogen între cele două helix-uri ale moleculei de ADN–'mamă'. Moleculele de ADN 'fiice' se sintetizează având ca substrat specific ('template') aceste două helix-uri primare, din ADN-ul 'mamă. Întregul proces este semiconservativ, în sensul că pentru fiecare moleculă de ADN 'fiică' se sintetizează 'de novo' doar un helix complementar; cel de-al doilea venind de la ADN-ul 'mamă'. Una dintre enzimele esențiale care catalizează sinteza noului helix al moleculelor de ADN 'fiice', sintetizată prima dată (pentru *E. Coli*) în anul 1958 de către grupul condus de Arthur Kornberg, este denumită ADN-polimeraza I.

În principiu, sinteza moleculei de ADN 'fiică' reprezintă adiția catalizată şi neîntreruptă (pas cu pas) a unor noi baze, complementare celor de pe helix-ul substrat (provenit de la ADN-ul 'mamă').

Condițiile şi etapele esențiale în sinteza unei molecule de ADN 'fiică' sunt următoarele:

a. Toate cele patru baze activate (denumiți precursori activați), ce vor constitui noul helix al ADN-ului 'fiică' (i.e., dATP, dGTP, dTTP şi dCTP) trebuie să fie prezente în mediul de sinteză, alături de Mg^{2+}, ADN polimeraza

b. ADN-polimeraza catalizează adiția de deoxiribonucleotide conjugate, începând de la capătul 3`-hidroxil al unui helix (denumit *primer*) de ADN preexistent în mediul de sinteză

c. Sinteza moleculei de ADN 'fiică' continuă în acest mod, iar bazele sunt adăugate conform secvenței complementare de baze de pe un helix provenind de la ADN-ul 'mamă'

d. ADN-polimeraza catalizează formarea unei legături fosfodiesterice (şi eliberarea simultană a unei grupări pirofosfat – reacție exoenergetică) între două baze adiacente de pe noul helix al moleculei de ADN 'fiică', doar dacă acele baze sunt complementare (în sensul explicat în capitolul anterior) cu baze de pe helix-ul 'mamă'.

3.4. *Expresia genelor*

Cu toate că molecula de ADN este cea care conține informația genetică, ea nu reprezintă substratul direct şi nemijlocit al transmiterii acestei informații (i.e., sinteza proteică). În lanțul transmiterii informație genetice, veriga de bază o constituie macromolecula de ARN. Astfel, informația genetică în toate celulele normale se transmite după următoarea schemă:

$$ADN \xrightarrow{transcriere} mARN \xrightarrow{translatie} Proteina \qquad (3.1)$$

Celulele conțin mai multe forme de ARN; astfel, *ARN-ul mesager* (mARN) este implicat în sinteza de noi proteine și este sintetizat pentru fiecare genă (sau grup de gene) într-un proces celular denumit **transcriere**. ARN-ul de transfer (tARN) este implicat în transportul aminoacizilor în forma activată spre ribozomi, unde are loc formarea de legături peptidice între ei; ordinea în secvența primară a acestor aminoacizi pentru proteina nou sintetizată se realizează respectând 'codul' înscris pe mARN. *ARN-ul ribozomal* (rARN) este componenta majoră a ribozomilor. În celula *E. coli*, rARN este cel mai abundent (80 %), urmat de tARN (15 %) și mARN (5 %).

Toate formele de ARN celular (deci și mARN) sunt sintetizate în celulă (în nucleu – pentru celulele eucariote) de către enzime specifice, denumite ARN-polimeraze (descoperite în 1960 de către Jerard Hurwitz și Samuel Weiss). În *E. coli*, sinteza de mARN se desfășoară în următoarele condiții:

a. Localizarea unui substrat specific ('template') de ADN, care conține gena de exprimat

b. Mediul de sinteză (nucleul celulei) trebuie să conțină ribonucleotide trifosfatice specifice (ATP, GTP, UTP și CTP) (precursori activați)

c. Prezența ionilor de Mg^{2+} sau Mn^{2+} este obligatorie pentru sinteza moleculei de mARN.

Sinteza moleculei de mARN este asemănătoare, în unele privințe, cu sinteza ADN-ului 'fiică' (Fig. 20): direcția de sinteză este 5` → 3`, mecanismul de elongare al moleculei create se bazează tot pe legături fosfodiesterice (și eliberare de grupări chimice pirofosfat, în cursul unei reacții exoenergetice) între două nucleoside adiacente. Spre deosebire de sinteza ADN-ului 'fiică' însă, în timpul sintezei mARN, ARN-polimeraza nu necesită prezența unui primer în mediul de sinteză. În *E. coli*, toate tipurile de ARN sunt sintetizate cu ajutorul unui singur tip de ARN-polimeraza (spre deosebire de cazul celulelor mamiferelor, unde există mai multe tipuri de ARN-polimeraze).

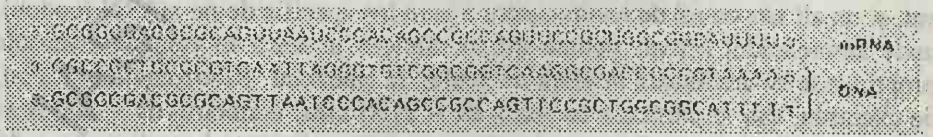


Fig. 20. Secvența de baze a mARN-ului complementar unei matrițe ('*template*') de ADN, care conține gene ce catalizează sinteza triptofanului

Următoarea etapă în transmiterea informației genetice este de sinteză a proteinelor (translație), urmărind un anumit 'cod' înscris în macromolecula de mRNA generată în procesul de transcriere. Sinteza proteică are loc prin adiția succesivă în direcția amino-carboxil a aminoacizilor ce formează structura primară a proteinei nou formate. Este cunoscut, însă, că formarea unei legături peptidice între grupările amino şi carboxil a doi aminoacizi nu este un proces favorabil termodinamic; 'proteina-adaptoare', ce serveşte drept intermediar în acest proces de elongare a proteinei nou-sintetizate, se numeşte ARN de transfer (tARN). 'Activarea' aminoacizilor ce trebuie aşezați în noua structură primară a proteinei de sintetiză se realizează în cursul unei reacții (de esterificare) în care gruparea carboxil a aminoacidului este legată fie la gruparea 2`, fie la gruparea 3`- hidroxil a unității de riboză de la capătul 3` a tARN. Rezultatul acestei reacții este un aminoacid intermediar activat, denumit animoacil-tARN. În 1957, Paul Zamecnik şi Mahlon Hoagland au descoperit enzima ce catalizează reacția de activare descrisă mai sus, şi care se numeşte aminoacil-tARN sintetaza.

Reacția totală de activare a unui aminoacid, ce precede procesul de difuzie al său spre locul de sinteză al noii proteine, este:

$$Aminoacid + ATP + tARN + H_2O \rightarrow aminoacil\text{-}tARN + AMP + 2P_I \quad (3.2)$$

Enzimele ce catalizează reacții de forma celor arătate mai sus (aminoacil-tARN sintetase) au următoarele proprietăți:

a. Există cel puțin o asemenea enzimă pentru fiecare aminoacid

b. Aceste enzime diferă foarte mult în greutate şi componență cuaternară (componența de subunități)

c. Aminoacil-tARN sintetaz – ele au un foarte pronunțat caracter de specificitate şi selectivitate pentru recunoaşterea aminoacidului ce trebuie activat şi tARN-ul specific acceptor ('cărăuş').

Diferitele tipuri de tARN au structuri topologice comune, având caracteristic un *site* (loc de interacție specific) pentru ataşarea aminoacidului ce trebuie activat, şi un alt *site* cu rol de recunoaştere a unui loc specific de pe mARN (codon), unde aminoacidul activat trebuie dirijat. Sinteza proteică în celulele eucariote propriu-zise se desfăşoară în afara nucleului, în ribozomi. Ribozomul din *E.coli*, de exemplu, este o particulă cu masa de ~ 2700 kDa, diametrul de ~ 200 Å şi care poate fi disociată într-o subunitate mare (coeficient de sedimentare 50 Svedberg) şi una mică (coeficient de sedimentare 30 S); aproape două treimi din masa unui ribozom este constituită din ARN ribozomal (rARN).

În sinteza coerentă a unei proteine, un rol esențial îl are dispunerea corectă de către diferite molecule tARN a aminoacizilor specifici, în structura primară a proteinei sintetizate; codul după care aminoacizii sunt plasați în structura primară este înscris pe mARN-ul ce codează acea proteină, este alcătuit din secvențe tri-bazice (de A, G, U, sau C) și este denumit codon.

Definim astfel codul genetic ca fiind relația între secvența de baze din structura primara a unei molecule de ADN (sau mARN) și secvența primară de aminoacizi din proteina sintetizată.

Codul genetic este degenerat (mulți aminoacizi sunt codați de mai multe secvente de tripleți bazici – doar triptofanul și metionina sunt codați de secvențe unice de tripleți bazici) și universal; pornind de la bacterii și terminând cu organismele superioare, aminoacizii specifici sunt codați de aceleași triplete bazice (denumite codoni). Astfel, macromolecule de mARN pot fi translatate corect chiar și în alte celule, aparținând altei specii decât cea de la care provine mARN-ul respectiv.

Este important de menționat ca există o corespondență liniară între diferite gene și produșii lor polipeptidici (pe care îi codează în procesul de translație); altfel spus, ordinea genelor în molecula de ADN este aceeași cu ordinea secvențelor de aminoacizi (sau polipeptide) din proteina sintetizată.

O proprietate foarte importantă a genelor celulelor eucariote este că în structura acestora există anumite regiuni (secvențe de baze) care nu codează nici o secvență polipeptidica cu rol funcțional, regiuni care se numesc **introni**; secvențele de baze din structura unei gene ce au corespondent în stucturi polipeptidice se numesc **exoni**. În cursul unui proces denumit 'despicare' ('splicing'), mARN-ul sintetizat, având ca suport specific ('template') ADN-ul celulelor eucariote, conține în structura primară doar exonii unei gene specifice (mesaj genetic 'neîntrerupt).

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

4. Teoria Debye-Hückel. Potențialul de membrană în aproximația Gouy-Chapman

Utilizarea modelelor de interacțiuni elementare ('ion-ion', 'dipol-ion' și 'dipol-dipol') în cazul sistemelor de macromolecule biologice, asociate cu calcule matematice elementare dovedesc că forțele de interacțiune manifestate între biomolecule sunt de magnitudine considerabilă; fără existența și utilizarea unei metode care să mijlocească diminuarea magnitudinii acestor interacțiuni, unele clase de moleculele ar exista doar în stare coezivă, făcând astfel imposibilă desfășurarea funcției lor specifice. Nu este probabil întâmplător faptul că evoluția vieții a avut loc într-un mediu apos, unde magnitudinea interacțiunilor electrostatice este diminuată datorită caracterului dipolar al moleculelor de apă. Suplimentar însă, natura a prezentat și alte soluții adecvate pentru modularea tăriei interacțiunilor inter-moleculare; această soluție se bazează pe prezența în mediile apoase naturale a unor ioni anorganici, cum ar fi: Mg^{2+}, Ca^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, PO_3^{2-} etc. Întrebările firești care se pun în legătură cu prezența acestor ioni în mediile apoase se referă la utilitatea prezenței lor și a modului în care aceşti ioni afectează interacțiunile electrostatice între biomolecule. Răspunsurile la aceste întrebări au importanță majoră în înțelegerea modului în care biomoleculele își exercită funcția, având în vedere omniprezența ionilor anorganici în fluidele biologice naturale, precum și în cele utilizate în cercetări de laborator ale funcțiilor și proprietăților biomoleculelor.

Pentru a răspunde la aceste întrebări, în mod natural trebuie elaborat un model de studiu al interacțiilor în sistemul 'biomoleculă-ioni anorganici'.

În cele ce urmează, vom presupune că soluția în care se află biomoleculele de studiat este diluată, astfel încât fiecare biomoleculă este practic independentă în raport cu celelalte și excludem posibilele efecte de interacție electrostatice cu caracter cooperativ în populația biomoleculară. Pentru a simplifica evaluările matematice, presupunem că biomoleculele au geometrie sferică și sarcina lor netă este distribuită uniform, pe întreaga lor suprafață, iar distanța minimă la care se pot apropia o biomoleculă și un ion anorganic din soluție (pozitiv sau negativ) este limitată de raza lor finită. Dacă un observator ar reuși să facă o fotografie a acestui sistem, ar observa că în jurul biomoleculei se află distribuite, respectând regulele simetriei sferice, o colecție de ioni pozitivi și negativi ce formează o așa-numită atmosferă ionică.

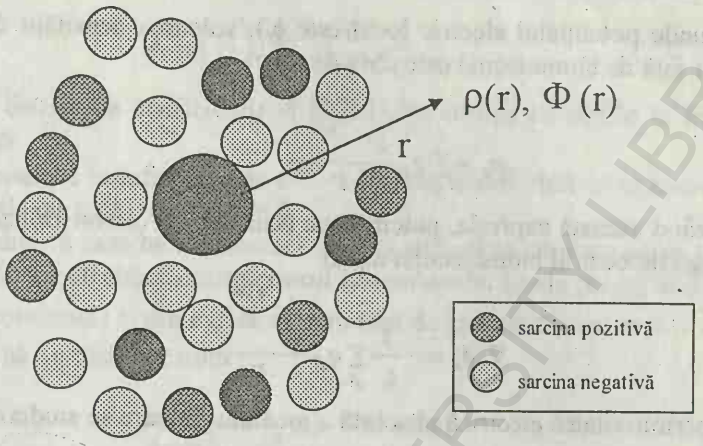


Fig. 21. Distribuția instantanee posibilă a sarcinilor pozitive și negative în jurul unei biomolecule încărcate electric pozitiv

La distanța r față de centrul biomoleculei, definim densitatea totală de sarcina electrică ρ(r) ce determină potențialul local ϕ(r).

Așa după cum vom demonstra în cele ce urmează, efectul existenței ionilor negativi și pozitivi ce compun atmosfera ionică în jurul biomoleculei este de a ecrana ('shield') electric biomolecula; altfel spus, valoarea potențialului electric local ϕ(r) este mai mică în prezența atmosferei ionice decât în cazul în care biomolecula ar fi plasată în vid.

În acest scop, vom determina distribuția de sarcină electrică din jurul unei biomolecule și, implicit, distribuția potențialului electric în jurul acesteia.

Definim valoarea medie a densității de sarcină a ionilor pozitivi și negativi prin:

$$\rho(r) = \sum_{\beta} \frac{q_\beta}{V} \qquad (4.1)$$

unde sumarea (β) se face după ionii pozitivi și negativi conținuți în volumul soluției (V).

Vom presupune în continuare că în jurul biomoleculei (identificată prin α), distribuția de sarcină electrică din atmosfera ionică este de tip Boltzmann.

Notând prin:

$$W_{\alpha\beta} = q_\beta \phi_r \qquad (4.2)$$

energia necesară pentru a aduce sarcina q_β de la înfinit la distanța r de biomole-

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

cula α (unde potențialul electric local este ϕ_r), valoarea densității de sarcină la distanța r față de biomoleculă este dată de:

$$\rho_r = \sum_\beta q_\beta \frac{e^{\left(-\frac{q_\beta \phi_r}{kT}\right)}}{V} \tag{4.3}$$

Utilizând această expresie, putem scrie ecuația lui Poisson-Boltzmann la distanța r față de centrul biomoleculei astfel:

$$\nabla^2 \phi_r = -\frac{1}{\varepsilon} \sum_\beta q_\beta \frac{e^{\left(-\frac{q_\beta \phi_r}{kT}\right)}}{V} \tag{4.4}$$

(ε este permitivitatea electrică absolută a mediului în care se studiază fenomenul descris).

Dacă grupăm speciile ionice asemănătoare în forma N_i, ecuația de mai sus devine:

$$\nabla^2 \phi_r = -\frac{1}{\varepsilon} \sum_i N_i q_i \frac{e^{\left(-\frac{q_i \phi_r}{kT}\right)}}{V} \tag{4.5}$$

Ecuația de mai sus se numeşte ecuația Poisson-Boltzmann.

Această ecuație este o ecuație diferențială în ϕ_r, care este dificil de rezolvat în forma originală; Debye şi Hückel au presupus că energia potențială locală a ionilor în câmpul electric de potențialul ϕ_r este mult mai mică în comparație cu energia termică a lor (kT). Astfel, utilizând dezvoltarea în serii de puteri a funcției exponențiale şi neglijând (datorită ipotezei de mai sus) termenii superiori, putem scrie:

$$e^x \approx 1 + x$$

Deoarece în volumul soluției în care facem aceste evaluări presupunem existența condiției de electroneutralitate ($\sum_i N_i q_i = 0$) (întotdeauna o sare - NaCl de exemplu – va genera prin disociere în soluție apoasă concentrații egale de ioni pozitivi de Na şi negativi de Cl), ecuația Poisson-Boltzmann devine liniară:

$$\nabla^2 \phi_r = \kappa^2 \phi_r \tag{4.6}$$

unde:

$$\kappa^2 = \frac{1}{\varepsilon kT} \sum_i N_i q_i^2 \tag{4.7}$$

Soluția ecuației lui Poisson-Boltzmann liniară este de forma:

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

$$\phi_r = \left(\frac{A}{r}\right)e^{-\kappa r} + \left(\frac{B}{r}\right)e^{\kappa r} \tag{4.8}$$

Pentru a determina coeficienții A și B, vom utiliza condițiile la limită ale acestei ecuații.

Astfel, deoarece la infinit (unde $e^{-\kappa r} \rightarrow 0$) potențialul electric în jurul biomoleculei are valoare nulă, rezultă B = 0.

Presupunând că raza biomoleculei este a și impunând condiția ca pe frontiera ionului câmpurile electrice din interiorul biomoleculei (unde potențialul electric are valoare constantă) și din exteriorul său (dat de ecuația de mai sus $\overrightarrow{E} = -\nabla\phi_a$, pentru r = a) să fie egale, rezultă:

$$\frac{q_\alpha}{4\pi\varepsilon a^2} = \frac{1}{a^2}Ae^{-\kappa a}(1+\kappa a) \tag{4.9}$$

unde q_α este sarcina biomoleculei considerate.

Derivând din expresia de mai sus valoarea coeficientului A, rezultă că expresia potențialului electric la distanța r în jurul biomoleculei încărcate cu sarcina q_α este:

$$\phi_r = \frac{q_\alpha e^{\kappa a}e^{-\kappa r}}{4\pi\varepsilon r(\kappa a+1)} \tag{4.10}$$

Este evident că în cazul absenței sarcinilor ionice din volumul în care se află imersată biomolecula (κ=0), formula de mai sus capătă forma bine-cunoscută din electrostatica clasică, ce dă valoarea potențialului electric în jurul unei sarcini, la distanța r de centrul sarcinii.

Pentru a afla semnificația fizică a coeficientului κ, vom exprima (cu ajutorul ecuațiilor de mai sus) valoarea densității de sarcină spațială la distanța r față de centrul biomoleculei astfel:

$$\rho_r = -q_\alpha e\kappa^2\frac{e^{-\kappa r}}{r} \tag{4.11}$$

După cum era de așteptat, în cazul în care biomolecula este încărcată pozitiv, densitatea de sarcină netă din jurul său va fi negativă (și viceversa).

Sarcina netă conținută într-o regiune sferică din jurul biomoleculei, ce se extinde de la r la r+dr, este dată de:

$$dq_{dr} = \rho_r 4\pi r^2 dr \tag{4.12}$$

Sarcina netă conținută într-un volum sferic în jurul biomoleculei este deci dependentă de raza acelui volum, iar pentru a obține dimensiunea acelei raze pentru care sarcina spațială conținută are valoare maximă utilizăm relația:

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

$$\frac{dq}{dr} = 0 \tag{4.13}$$

Folosind expresia pentru distribuţia radială a densităţii de sarcină spaţială în jurul biomoleculei, rezultă că distanţa faţă de centrul biomoleculei, la care sarcina netă din jurul său este maximă, este:

$$r = \kappa^{-1} \tag{4.14}$$

Astfel, κ are dimensiunea unei distanţe inverse iar mărimea κ^{-1} este numeric egală cu raza sferei din jurul biomoleculei ce conţine sarcina spaţială netă maximă; κ se mai numeşte distanţa Debye- Hückel.

Una din aplicaţiile importante ale acestei teorii se referă la deducerea coeficientului de activitate ionică a unei specii ionice într-o soluţie neideală, în care concentraţia altor ioni este finită.

Valoarea energiei proprii (vezi capitolul *Energia Born*) a unui ion α de raza a pentru încărcarea sa de la sarcina nulă la sarcina q_α -valoarea 'instantanee' a sarcinii ionului în procesul de încărcare este dată de $q = \lambda q_\alpha$, unde λ are valori între 0 şi 1) este dată de:

$$\mu_\alpha^{el.} = \int_0^1 \phi_\alpha(\lambda) q_\alpha d\lambda = -\frac{\frac{q_\alpha^2}{8\pi\varepsilon}\kappa}{(1+\kappa a)} \tag{4.15}$$

Pentru potenţialul chimic al acestei specii ionice, putem scrie relaţia:

$$\mu^{total} = \mu^{ideal} + \mu^{el.} \tag{4.16}$$

unde μ^{ideal} este potenţialul chimic al speciei ionice considerate în absenţa unei atmosfere ionice în jurul său.

Prezenţa altor specii ionice în volumul în care se află specia ionică α conduce deci la modificarea potenţialului său chimic; alternativ, putem scrie expresia de mai sus astfel:

$$\mu^{total} = \mu^0 + kT \ln \gamma c \tag{4.17}$$

unde μ^0 este potenţialul chimic al speciei ionice α în condiţii standard de presiune şi temperatură iar c este concentraţia speciei ionice α.

Parametrul γ este ales pentru a exprima abaterea de la cazul soluţiei ideale a valorii potenţialului chimic al speciei ionice α.

Pentru a determina cantitativ acest parametru, ne folosim de exprimarea potenţialului chimic al speciei ionice α în condiţii de soluţie ideală:

$$\mu^{ideal} = \mu^0 + kT \ln c \tag{4.18}$$

BCU "AL. I. CUZA" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Din combinarea ultimelor trei relații, rezultă pentru parametrul γ următoarea expresie:

$$\ln\gamma = \frac{\mu^{el}}{kT} \tag{4.19}$$

Există anumite exemple naturale în care geometria configurației 'sistem încărcat electric-populație ionică' diferă radical de exemplul relativ simplu discutat mai sus (i.e., sistem 'biomoleculă-populație ionică'), cum ar fi interfața dintre membrana biologică (care este aproximată geometric ca o suprafață plană) și soluția externă. Datorită faptului că grupărilor constituente ale membranei biologice (e.g., fosfolipide, proteine integrale și periferice, glicolipide), au fie sarcina netă diferită de zero, fie există în stări specifice de ionizare la diferite valori ale pH-ului soluției în care se află, suprafața membranelor biologice se consideră ca fiind purtătoare de sarcină electrică netă diferită de zero (în cele mai multe cazuri, sarcina negativă). În mediul interfeței membrană biologică-soluție, ionii liberi din soluție (pozitivi și negativi) vor difuza liber, iar distribuția lor în vecinătatea membranei este dată de teoria statistică a lui Boltzmann. La fel ca și în cazul anterior, va exista o anumită grosime a acestei interfețe în care condiția de electroneutralitate (concentrația ionică de sarcini pozitive egală cu cea a sarcinilor negative) nu mai este respectată, iar rezultatul este o formă particulară a profilului potențialului electric în această regiune.

Pentru a elucida expresia cantitativă a variației potențialului de membrană al unei membrane biologice încărcate electric și aflată într-o soluție ionică, vom utiliza următoarele ipoteze:

– sarcinile ionice de pe suprafața membranei (la interfața membrană – soluție externă) sunt considerate punctuale;
– sarcinile ionice sunt răspândite uniform pe toată suprafața membranei;
– în soluția ionică unde este imersată biomembrana se află diferite specii ionice, cu concentrații n_i și valenta z_i;
– suprafețele membranare sunt considerate plane

În aceste condiții, la distanța x de la suprafața membranei, legătura între expresia potențialului electric $\Psi(x)$ și densitatea de sarcină electrică locală $\rho(x)$ este dată de ecuația lui Poisson-Boltzmann (ca mai sus):

$$\frac{d^2\Psi(x)}{dx^2} = -\frac{\rho(x)}{\varepsilon} = -\frac{1}{\varepsilon} e \sum_i n_i z_i e^{-\frac{z_i e \Psi(x)}{kT}} \tag{4.20}$$

unde x reprezintă distanța măsurată perpendicular pe suprafața membranei biologice studiate.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Semnificaţia mărimilor fizice din această formulă este aceeaşi ca mai sus, iar n_i reprezintă concentraţia ionilor cu valenţă z_i (măsurată la distanţe mari de biomembrană, unde efectele câmpului electric superficial sunt neglijabile) din soluţia fiziologică unde se află imersată biomembrana încărcata electric.

Presupunem în cele ce urmează cazul simplificat al unui amestec binar de ioni pozitivi şi negativi de concentraţie *n* din soluţia fiziologică, în care energia potenţială locală a ionilor în câmpul electric al biomembranei (unde potenţialul este $\Psi(x)$) este mult mai mică în comparaţie cu energia termică a lor (kT). Utilizând condiţiile la limită:

$$\Psi(x=0)=\Psi_0$$
$$\Psi(x\to\infty)=0 \qquad (4.21)$$
$$\left.\frac{d\Psi}{dx}\right|_{x\to\infty}=0,$$

prin integrarea ecuaţiei Poisson-Boltzmann de mai sus obţinem soluţia:

$$\Psi(x)=\Psi_0 e^{-\kappa x} \qquad (4.22)$$

unde:

$\Psi(x)$ este potenţialul electric la distanţa x de membrana celulară

Ψ_0 este valoarea potenţialului electric pe membrana celulară

$$\kappa=\sqrt{\sum_i \frac{n_i^2 z_i^2 e^2}{\varepsilon kT}}$$

n_i este concentraţia ionilor de valenţă z_i.

(Semnificaţia fizică a parametrului κ – lungimea Debye-Hückel – este aşa cum s-a discutat mai sus).

În cazul discutat mai sus, suprafeţele echipotenţiale din vecinătatea biomembranei sunt plane paralele cu aceasta.

Relaţia matematică între valoarea sarcinii electrice superficiale σ_0 (distribuită pe suprafaţa biomembranei, la x = 0) şi sarcina electrică din soluţia fiziologică este dată de:

$$\sigma_0=-\int_0^\infty \rho(x)dx \qquad (4.23)$$

În cazul energetic general, se poate arăta cu ajutorul relaţiilor scrise pâna acum că legătura între densitatea superficială de sarcină pe suprafaţa biomembranei σ_0 şi potenţialul electric pe suprafaţa membranei $\Psi(0)$ este dată de expresia:

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

$$\sigma_0 = 2\varepsilon RT \sum_i n_i \sqrt{e^{\left(-\frac{z_i F\Psi(0)}{RT}\right)} - 1} \qquad (4.24)$$

(semnificația fizică a mărimilor este așa cum a fost descrisă anterior; deoarece se consideră cazul simplificat al unui amestec ionic binar – de exemplu, Na^+ și Cl^- ce apar din disocierea în apă a NaCl, în expresia de mai sus sumarea se face de la 1 la 2 iar n_i este numeric egală cu concentrația inițială a NaCl).

Utilizând relațiile de mai sus și în condițiile energetice $\frac{ze\Psi(x)}{kT} << 1$, rezultă:

$$\sigma_0 = \varepsilon\Psi(0)\kappa \qquad (4.25)$$

După cum se observă din relația scrisă mai sus, în cazul unei biomembrane care este încărcată electric cu o sarcină constantă, dată de densitatea superficială de sarcină σ_0, valoarea locală a potențialului electric, chiar pe suprafața membranei, este o funcție dependentă de compoziția ionică a mediului apos în care este imersată membrana. Prin intermediul parametrului κ, valoarea potențialului local pe suprafața membranei $\psi(0)$ *scade* odată cu *creșterea* concentrației ionilor în soluția externă *chiar dacă* valoarea sarcinii superficiale rămâne constantă. Acest lucru are implicații deosebite în biofizica moleculară, după cum va fi arătat mai jos. Este bine de știut că în cazul proceselor moleculare membranare, mecanismul fizic al interacțiunii agonist (medicament, hormon, neurotransmițător etc.) – receptor are la bază (în marea majoritate a cazurilor) interacțiuni electrostatice între grupări ale aminoacizilor activi electric (dipolari sau încărcați electric) pe situsurile active ale sistemelor moleculare în interacțiune. (vezi capitolele anterioare, despre descrierea detaliată a principalelor forțe de interacțiune implicate).

Considerând că interacțiunea agonist – receptor are loc chiar pe suprafața membranei și că în mediul apos (soluție) energia liberă molară a agonistului este $G^0_{soluție}$ iar la nivelul membranei, după interacțiunea cu receptorul, energia sa liberă molară devine $G^0_{membrana}$, în lipsa unui potențial de membrană valoarea constantei de echilibru a reacției de disociere a sistemului agonist – receptor este:

$$K^0 = \frac{k_{membrana-solutie}}{k_{solutie-membrana}} = e^{-\frac{2(G^0_{solutie} - G^0_{membrana})}{RT}} \qquad (4.26)$$

unde:

– $k_{soluție\text{-}membrana}$ este valoarea constantei de reacție pentru asocierea agoniștilor din soluție pe biomembrana

$$(k_{solutie-membrana} = \frac{kT}{h} e^{-\frac{G^0_{membrana} - G^0_{solutie}}{RT}})$$

BCU "I. C. BRĂTIANU" LIBRARY

– $k_{membrana\ -\ soluţie}$ este valoarea constantei de reacţie pentru disocierea agoniştilor din biomembrana aflată în soluţie

$$\left(k_{membrana-solutie} = \frac{kT}{h} e^{-\frac{G^0_{solutie} - G^0_{membrana}}{RT}}\right)$$

În cazul în care biomembrana este încărcată electric, valoarea potenţialului electric la suprafaţa sa este dat de $\Psi(0)$; în aceste condiţii, valoarea energiei libere a agonistului pe membrană se va modifică astfel:

$$G_{membrana} = G^0_{membrana} + ze\Psi(0) \qquad (4.27)$$

unde produsul ze reprezintă sarcina electrică echivalentă a situsului activ al agonistului.

În situaţia descrisă mai sus, valoarea constantei de reacţie de disociere este dată de:

$$K = K^0 e^{\frac{2ze\Psi(0)}{RT}} \qquad (4.28)$$

Este deci evident că la valori diferite ale concentraţiei ionilor liberi în soluţia electrolitică a mediului unde are loc interacţiunea agonist – biomembrană, valoarea potenţialului electric de suprafaţă $\Psi(0)$ va fi diferită, şi deci constanta de reacţie de disociere a celor două sisteme (agonist şi receptor de pe biomembrană) va fi diferită; acest lucu poate avea implicaţii deosebite în manifestarea fiziologică a interacţiunii agonist - receptor.

O altă consecinţă imediată a existenţei potenţialului de suprafaţă $\Psi(0)$ şi a dependenţei lui de compoziţia ionică a soluţiei externe se referă la procesele de transport prin biomembrane; după cum va fi arătat în capitolele următoare, valoarea intensităţii curentului electric prin canale ionice depinde şi de valoarea concentraţiei locale a purtătorilor de sarcină (i.e., ioni difuzanţi).

În conformitate cu teoria expusă mai sus, dacă valoarea concentraţiei unor ioni difuzanţi cu sarcina (ze^-) în mediul extern este c, în vecinătatea suprafeţei membranei unde este inserat canalul ionic, concentraţia locală a acestora c(0) este dată de relaţia binecunoscută:

$$c(0) = ce^{-\frac{ze\Psi(0)}{kT}} \qquad (4.29)$$

Variaţii în compoziţia ionică a mediului extern (e.g., tipul, valenţa speciei ionice şi concentraţia speciilor ionice) are consecinţe imediate asupra valorii po-

tențialului de suprafață $\Psi(0)$, și deci asupra valorii concentrației locale a purtătorilor de sarcină.

Un alt exemplu ce subliniază importanța cunoașterii mecanismelor electrice la interfața biomembrană – soluție externă se referă la procesul cinetic de modulare a conductanței canalelor ionice de sodiu, denumit general 'gating'. Acest proces de 'gating' al canalelor ionice de sodiu este puternic electrogen, în sensul că depinde de valoarea câmpului electric intramembranar ce acționează asupra unor aminoacizi cu rol de 'sarcini electrice senzori' (vezi capitolele următoare). Câmpul electric modulator este dat de suma dintre o componentă externă și una intrinsecă macromoleculei, dată de prezența unor sarcini electrice fixe negative în vecinătatea senzorilor canalului ionic. Chiar dacă menținem componenta externă a câmpului electric modulator constantă, variații ale concentrației ionice în soluția în care este incubat canalul ionic produc variații ale câmpului electric modulator total ce acționează asupra 'sarcinilor electrice senzor' (Fig. 22).

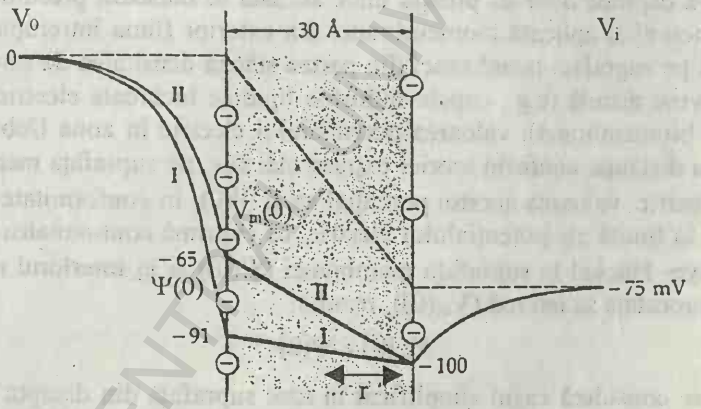


Fig. 22. Variația calitativă a câmpului electric intramembranar în funcție de valoarea potențialului electric de suprafață (-65 și -91 mV). Se consideră că unul din domeniile delimitate de biomembrană este la un potențial macroscopic nul (stânga), iar celălalt la – 75 mV

În figura de mai sus este exemplificată paradigma în discuție, conform căreia valoarea câmpului electric intramembranar depinde și de proprietățile electrice ale mediului în care este imersată. Așadar, dacă se consideră că valoarea densității de sarcină superficială σ_0 de pe suprafața membranei este nulă iar condiția de electroneutralitate este respectată în interiorul biomembranei, valoarea câmpului electric intramembranar va fi constantă:

$\rho_{in} = 0, deci:$

$$div\vec{E}_{in} = \frac{\rho_{in}}{\varepsilon_{in}} = 0 \Rightarrow \vec{E}_{in} = ct. \tag{4.30}$$

– E_{in} este câmpul electric în interiorul membranei

– ρ_{in}, ε_{in} sunt valorile densității de sarcină, respectiv a permeabilității electrice absolute din interiorul membranei.

Formula de mai sus (4.30) indică faptul că în interiorul membranei studiate, potențialul electric variază liniar cu distanța, caracteristică ilustrată în Fig. 22.

În cazul studiat, condiția de electroneutralitate trebuie înțeleasă în sensul că valoarea intensității câmpului electric intermembranar nu determină ionizarea grupărilor chimice ce compun miezul hidrofob al membranei celulare studiate.

Aşadar, din formula de mai sus (4.30) rezultă că valoarea diferenței de potențial electric în interiorul membranei (unde condiția de electroneutralitate este respectată) va depinde doar de poziția unde aceasta se măsoară precum şi de diferența de potențial aplicată biomembranei din exterior (linia întreruptă – V_o-V_i). Dacă însă pe suprafața membranei din partea stângă densitatea de sarcină superficială devine nenulă (e.g., capete hidrofile lipidice încărcate electric, adsorbția ionică pe biomembrană), valoarea potențialului electric în zona Debye- Hückel variază cu distanța, conform teoriei expuse mai sus; pe suprafața membranei încărcate electric, valoarea acestui potențial va fi $\Psi(0)$. În conformitate cu una din condițiile la limită ale potențialului electric, ce exprimă continuitatea acestuia în zona Debye- Hückel la suprafața membranei ($\Psi(0)$) şi în interiorul membranei, chiar pe suprafața sa internă ($V_m(0)$), rezultă:

$$V_m(0) = \Psi(0) \tag{4.31}$$

Dacă se consideră cazul simplificat în care suprafața din dreapta a biomembranei nu este încărcată electric, valoarea modulului câmpului electric în interiorul biomembranei, la distanța r (Fig. 22) , este dată de:

$$\left|\vec{E}(r)\right| = \frac{V_m(0) - V_i}{r} = \frac{\Psi(0) - V_i}{r} \tag{4.32}$$

Având în vedere formalismul matematic prezentat mai sus, devine evidentă legătura fizică între valoarea câmpului electric în interiorul biomembranei şi concentrația ionilor din mediul extern.

În acest fel, 'gating'-ul acestui canal ionic va fi diferit la valori diferite ale concentrației ionilor din soluția fiziologică în care el se află. Necunoaşterea influenței exercitate de variații ale concentrației ionilor din soluție asupra 'gating'-

ului canalului ionic conduce la aprecieri eronate asupra proprietăților biofizice ale acestuia.

Nu trebuie uitat că teoria expusă mai sus reprezintă o simplificare a cazului fizic real. Una dintre cele mai critice presupuneri pe care se bazează acest model analizat, cunoscut sub denumirea de modelul lui Gouy-Chapman, este că sarcinile electrice au raza zero (sarcini punctiforme).

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

5. Clasificarea forțelor intermoleculare

Datorită faptului ca din punct de vedere fizic, mecanismele de interacțiune dintre diverse macromolecule biologice, ioni, etc. sunt abordabile în termeni de forțe exercitate între acestea, este pertinentă prezentarea punctuală a importanței acestora pentru existența materiei vii.

Forțele care se exercită între ionii şi moleculele conținute într-un mediu se pot clasifica în următoarele categorii generale:

a. forțe electrostatice, care au origine pur electrostatică şi se exercită între molecule sau ioni ce posedă sarcină netă diferită de zero, sau prezintă momente electrice permanente de dipol, quadrupol etc;

b. forțe de polarizare, care se exercită între sarcini electrice sau dipoli permanenți şi atomi sau molecule, în care se induc dipoli temporari de către sarcinile sau dipolii permanenți;

c. forțe de natură cuantică. Exemple clasice în acest sens le constituie legătura covalentă, care produce coeziunea moleculară sau forțele de repulsie, ce apar între atomi sau molecule ca urmare a principiului de excluziune al lui Pauli.

Deorece deducerea detaliată a expresiei energiei de interacțiunei între atomi (sau molecule) cu caracter electric net diferit de zero sau caracter dipolar face obiectul unei prelegeri de *Electrostatică*, voi prezenta doar rezulatul final al calculelor matematice elementare.

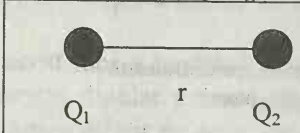
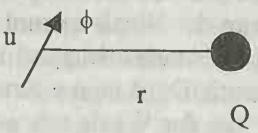
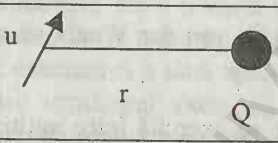
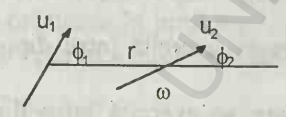
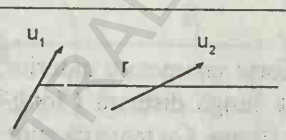
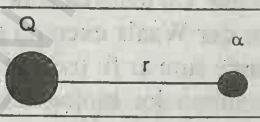
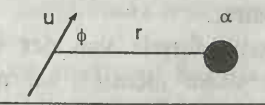
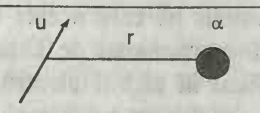
Diagrama următoare prezintă comprehensiv tipurile de interacțiuni electrostatice, cu expresia energiei de interacțiune a sistemelor implicate.

5.1. *Interacțiunile van der Waals*

În clasificarea prezentată mai sus au fost luate în discuție tipuri de forțe ce se exercită între sisteme atomice cu sarcină electrică sau care prezintă moment dipolar, şi care pot fi descrise esențial în cadrul electrostaticii clasice. Cu toate acestea, cu câteva sute de ani în urmă a fost observată experimental prezența şi a unei alte forțe care se exercită între *toți* atomii sau moleculele, chiar dacă aceste sisteme sunt neutre electic (nu prezintă momente dipolare sau sarcini nete), cum

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabel 2. Descrierea comprehensivă a celor mai importante tipuri de interacțiuni electrostatice prezente în sistemele biologice

Tipul de interacțiune	Reprezentare topologică	Energia de interacțiune
Sarcină – Sarcină		$\frac{Q_1Q_2}{4\pi\varepsilon_0 r}$
Sarcină (Q) – dipol (u)		$-\frac{Qu\cos(\phi)}{4\pi\varepsilon_0 r^2}$ (dipol fix)
		$-\frac{Q^2u^2}{6(4\pi\varepsilon_0)^2kTr^4}$ (dipol mobil)*
Dipol (u_1) – Dipol (u_2)		$-\frac{u_1u_2[2\cos\phi_1\cos\phi_2-\sin\phi_1\sin\phi_2\cos\omega]}{4\pi\varepsilon_0 r^3}$ (dipoli ficși)
		$-\frac{u_1^2u_2^2}{3(4\pi\varepsilon_0)^2kTr^6}$ (dipoli mobili)*
Sarcină (Q) – sistem atomic nepolar (α)		$-\frac{Q^2\alpha}{2(4\pi\varepsilon_0)^2r^4}$
Dipol (u) – sistem atomic nepolar (α)		$-\frac{u^2\alpha(1+3\cos^2\phi)}{2(4\pi\varepsilon_0)^2r^6}$ (dipol fix)
		$-\frac{u^2\alpha}{(4\pi\varepsilon_0)^2kTr^6}$ (dipol mobil)*

- În cazurile notate prin (*), expresiile finale ale energiilor de interacțiune se obțin având în vedere că distribuția spațială a dipolilor electrici mobili este dată de legea de distribuție Boltzmann după energii, iar în calcul se consideră sumarea efectelor tuturor orientărilor spațiale posibile (pentru detalii, este utilă consultarea unui tratat de *Electrodinamică*).

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- Semnificaţia mărimilor fizice din reprezentarea de mai sus este:
  - u: moment electric dipolar
  - Q: sarcină electrică
  - ϕ: unghi polar
  - ω: unghi azimutal
  - r: distanţă între sistemele electrice considerate
  - α: polarizabilitatea sistemului atomic

ar fi: heliu, dioxidul de carbon, molecule hidrocarbonate, etc. Aceste forţe sunt cunoscute sub denumirea de forţe van der Waals şi sunt încă cel mai puţin cunoscute din punct de vedere al mecanismului de apariţie şi manifestare, chiar dacă manifestarea lor este omniprezentă. După cum s-a menţionat, poate cea mai remarcabilă caracteristică a forţelor van der Waals este *universalitatea* lor (ca şi forţele gravitaţionale).

Într-o clasificare generală, forţele van der Waals se pot împărţi în trei categorii:

- interacţiuni de orientare, care se exercită între multipoli permanenţi (**interacţiuni Keeson**)
- interacţiuni de inducţie, care se exercită între dipoli permanenţi şi dipoli induşi (**interacţiuni Debye**)
- interacţiuni de dispersie, care se exercită între dipoli instantanei (**interacţiuni London**)

În comparaţie cu tipurile de forţe enumerate anterior, forţele van der Waals sunt forţe slabe şi considerate de lungă distanţă ('long-range'). Ele acţionează consistent pe distanţe între 0.2 şi 10 nm. Cu toate că sunt forţe relativ slabe, când se manifestă cooperativ, forţele van der Waals exercită rol un esenţial în multe fenomene fizice, biologice sau chimice cum ar fi: tensiunea superficială, proprietăţile gazelor reale, stabilitatea membranelor biologice, adeziunea moleculară, interacţiunea specifică enzimă-substrat.

În cele mai multe dintre situaţii, forţele van der Waals sunt considerate atractive, mai ales în cazul moleculelor identice, iar manifestarea lor macroscopică depinde apreciabil de distanţele pe care aceste forţe acţionează într-un caz specific. Trebuie menţionat că mecanismul de acţiune al forţelor van der Waals nu poate fi pe deplin explicat în cadrul electrodinamicii clasice, fiind necesară descrierea acestora în termeni de mecanică cuantică.

Pentru a surprinde intuitiv mecanismul de acţiune al forţelor van der Waals, putem considera interacţiunea între o moleculă polară şi una nepolară: printr-un mecanism de inducţie dipolară, în molecula nepolară va apărea un moment

dipolar temporar, ceea ce duce la apariția unei interacțiuni tip dipol–dipol indus. Acesta a fost în esență primul mecanism propus pentru explicarea forțelor van der Waals, însă el nu a putut explica apariția unei forțe de atracție între molecule fără dipol permanent.

O altă încercare în acest sens a constituit-o următoarea paradigmă: chiar dacă o moleculă nu are moment dipolar permanent, nu este exclus ca ea să posede moment dipolar *instantaneu* diferit de zero, iar medierea momentului dipolar instantaneu, pentru întreaga perioadă de măsurare, duce la un moment dipolar mediu nul. Un asemenea moment dipolar tranzitoriu din prima moleculă poate induce un moment dipolar complementar în cea de-a doua moleculă, iar rezultatul interacțiunii între aceste momente dipolare este o forță de atracție. Când momentul dipolar tranzitoriu din prima moleculă își schimbă valoarea în timp, momentul dipolar indus 'urmărește' fidel această variație făcând ca două molecule nepolare să fie atrase continuu prin acest tip de interacțiune.

Pentru o determinare cantitativă a unei aproximări a forței van der Waals, să considerăm în continuare următorul exemplu, propus inițial de David Tibor (1974): fie doi atomi de hidrogen reprezentați în modelul lui Bohr, în care electronul fiecărui atom orbitează în jurul nucleului pe o traiectorie circulară, cu parametri bine specificați (cea mai mică rază Bohr are valoarea 5.3×10^{-9} cm).

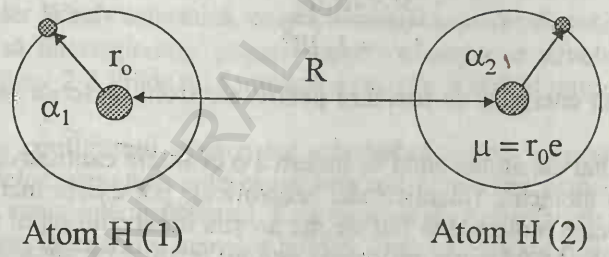


Fig. 23. Model simplificat, propus pentru estimarea cantitativă simplificată a forței van der Waals

Dacă vom considera că electronul fiecărui atom orbitează pe traiectoria cu raza r_0, atunci putem defini momentul dipolar instantaneu (al atomului 1, de exemplu) prin $\mu_1(t)$ iar $\mu_1(t) = r_0 e$. (e este sarcina electronului). Acest moment dipolar instantaneu este deci diferit de zero, iar valoarea sa mediată pe o perioadă egală cu perioada de miscare a electronului este nulă. Discutând doar în termeni calitativi, putem scrie următoarea relație ce dă dependența între câmpul electric al acestui dipol la distanța R între cei doi atomi și valoarea instantanee a momentului dipolar:

$$E_1(t) \approx \frac{\mu_1(t)}{R^3} \tag{5.1}$$

Momentul dipolar indus în cel de-al doilea atom de hidrogen, cu polarizabilitatea α_2, este:

$$\mu_2(t) = \alpha_2 E_1(t) \approx \frac{\alpha_2 \mu_1(t)}{R^3} \tag{5.2}$$

În acest caz, valoarea energiei de interacţie între cei doi dipoli este:

$$U(t) \approx \frac{\mu_1(t)\mu_2(t)}{R^3} = -\frac{\alpha_2 r_0^2 e^2}{R^6} \tag{5.3}$$

După cum se vede, deoarece valoarea energiei de interacţiune variază cu R^6, valoarea forţei de interacţiune va varia cu R^7 (caracter de forţă slabă în comparaţie cu interacţiunile coulombiene); semnul '-' în faţa energiei de interacţiune sugerează caracterul atractiv al forţelor van der Waals, aşa cum sunt abordate în acest model.

Utilizând un formalism cuantic, London a derivat expresia energiei de interacţiune van der Waals între două molecule neidentice situate la distanţa R:

$$U = -\frac{3I_1 I_2 \alpha_1 \alpha_2}{2(I_1 + I_2)R^6} \tag{5.4}$$

unde I_1 şi I_2 sunt energiile de ionizare pentru electronii exteriori ai celor două molecule.

Nu trebuie uitat că, atunci când se încearcă o evaluare cantitativă a forţei van der Waals între molecule (identice sau neidentice), pot exista mai mulţi dipoli tranzitorii în fiecare moleculă şi fiecare din aceştia induce un dipol tranzitoriu în cealaltă moleculă. Astfel, forţa rezultantă este un rezultat de ansamblu al efectelor tuturor dipolilor tranzitorii.

Menţionam la începutul acestui capitol că forţele van der Waals sunt esenţiale în alcătuirea membranelor lipidice. Prin definiţie (şi vom reveni cu detalii în capitolele următoare), lipidele sunt molecule organice insolubile în apă, dar solubile în lichide nepolare (cloroform, eter, benzen). Ele sunt constituite esenţial dintr-un capăt polar, hidrofil şi unul nepolar, hidrofob, cu structura de hidrocarbonat. În soluţie apoasă, capetele polare ale lipidelor interacţionează cu moleculele de apă, iar capetele hidrocarbonate interacţionează între ele mediate de forţele van der Waals.

În soluţie apoasă, unul din modurile de organizare a lipidelor este cel micelar.

În Fig. 24, capătul polar al unei lipide este reprezentat printr-un cerc iar coada nepolară prin două linii punctate.

După cum este remarcat, în procesul de formare al micelelor, părțile hidrocarbonale (hidrofobe) ale lipidelor sunt 'excluse' de la contactul direct cu soluția apoasă, ele interacționând doar între ele prin forțe van der Waals. Pe de altă parte, capetele polare (uneori încărcate electric) ale lipidelor pot interacționa favorabil cu moleculele polare de apă mai ales prin interacțiuni ion-dipol și/sau dipol-dipol. Astfel, configurația de energie *minimă* a acestui sistem este cea în care lipidele se auto-organizează ca mai sus; rezultatul net al celor două tipuri majore de interacțiuni (van der Waals între capetele nepolare ale lipidelor și electrostatice între capetele lor polare și moleculele de solvent) este obținerea unui sistem molecular cu energie totală potențială minimă. Deoarece intensitatea forțelor van der Waals este mică, există un număr minim de molecule de lipide care trebuie să interacționeze colectiv pentru a obține o structură micelară în stare de echilibru; 2-3 lipide nu formează o micelă, numărul minim fiind de ordinul sutelor.

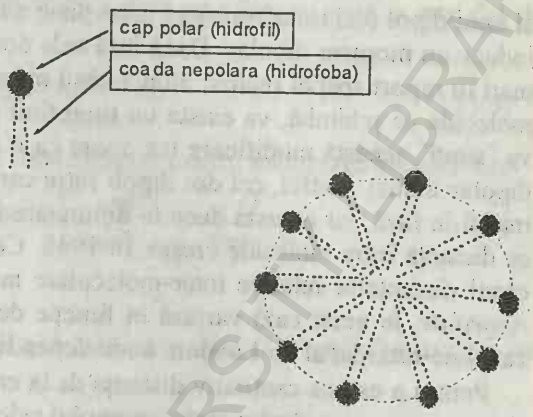


Fig. 24. Reprezentarea modului de organizare micelar al moleculelor lipidice în solvenți apoși

În anumite configurații geometrice ale mediului apos și pentru concentrații date ale lipidelor, structura auto-organizată are geometrie plană, de membrană lipidică (vezi capitolele următoare). Este esențial de remarcat un aspect: ca și în cazul micelelor, în cadrul sistemelor lipidice auto-organizate planare (membrane celulare), forțele covalente (sau alte forțe tari) NU joacă nici un rol în stabilizarea sistemului. Aceasta conferă importanta proprietate de fluiditate a unei membrane lipidice, care este esențială pentru îndeplinirea funcțiilor sale biologice.

Așa cum menționam și în capitolele anterioare, forțele van der Waals au implicații extrem de importante în multe procese biologice, cum ar fi: interacțiunea specifică enzimă-substrat, configurația stabilă a ADN-ului, structura terțiară a proteinelor, interacțiunea proteină-membrană lipidică.

O altă proprietate interesantă și specifică a forțelor van der Waals se referă la caracterul lor de retardare.

Și în tratamentele lui Tibor și al lui London, s-a presupus implicit că dipolii tranzitoriu și cel indus variază în fază, conferind astfel proprietatea de valoare maximă a forței de interacțiune van der Waals. În aceste modele, câmpul electric

al unui dipol (cel tranzitoriu) se presupune a atinge instantaneu molecula în care induce un moment dipolar. Dacă însă cele două molecule sunt situate la distanțe mari în raport spațial relativ, atunci când momentul dipolar instantaneu al primei molecule se schimbă, va exista un timp finit până când cea de-a doua moleculă va 'simți' această modificare (ce apare ca o modificare implicită a momentului dipolar indus). Astfel, cei doi dipoli între care se va stabili interacțiunea nu vor mai fi în fază, iar aceasta duce la diminuare forței de atracție între ei pe măsură ce distanța între molecule creşte. În 1948, Casimir şi Polder au arătat că pentru cazul distanțelor relative inter-moleculare mari, forțele van der Waals (numite *retardate*, în acest caz) variază în funcție de distanța cu R^{-8} (spre deosebire de cazul ne-retardat al lui London, unde dependența este de tipul R^{-7}).

Pentru a estima cantitativ distanța de la care efectul de retardare îşi face simțită prezența, considerăm iarăşi exemplul celor 2 atomi de hidrogen: pentru cazul în care electronii se mişcă pe prima orbită a lui Bohr, perioada de rotație este de aproximativ $3x10^{-16}$ secunde; în acest timp, câmpul electric traversează distanța 10^{-7} m (100 nm). Deci, dacă doi atomi (molecule) sunt la o distanță mai mare de 50 nm, forța van der Waals ce apare între ei (ele) va fi complet retardată; la această distanță, primul dipol tranzitoriu face o oscilație completă în timpul în care câmpul său electric ajunge la celălalt atom şi se întoarce.

Experimente efectuate în anii 1950 şi 1960 au demonstrat pe deplin caracterul de retardare al forțelor van der Waals.

5.2. *Energia Born*

În cazul în care un ion este plasat în vid sau într-un mediu oarecare şi într-o configurație în care interacțiunea sa cu alte sisteme de sarcină (ioni, dipoli, cuadrupoli, etc.) este absentă, el posedă totuşi energie liberă de natură electrostatică. În vid, această energie este denumită energie proprie a ionului ('self-energie') iar într-un mediu polarizabil oarecare se numeşte energie Born.

Pentru a determina expresia cantitativă a acestei energii, să considerăm următorul experiment mintal:

Ne putem imagina că valoarea sarcinii totale (Q) a ionului cu raza a, aflat într-un mediu oarecare caracterizat electric prin permitivitatea relativă ε_r, este realizată prin încărcarea (electrizarea) graduală a unei sfere cu aceaşi rază şi inițial descărcată (sarcina totală nulă), cu cantități de sarcină dq.

Astfel, dacă la un moment intermediar în procesul de încărcare sarcina ionului va fi q ($q<Q$), lucrul mecanic efectuat dw pentru a aduce în continuare (în

procesul de încărcare) o sarcină *dq* de la infinit pe sfera cu rază *a* este dat de relația:

$$dw = \frac{qdq}{4\pi a \varepsilon_0 \varepsilon_r} \tag{5.5}$$

Deci, expresia lucrului mecanic total efectuat pentru încărcarea ionului este:

$$W_{total} = \int_0^Q dw = \int_0^Q \frac{qdq}{4\pi a \varepsilon_0 \varepsilon_r} = \frac{Q^2}{8\pi a \varepsilon_0 \varepsilon_r} \tag{5.6}$$

unde:

- a este raza ionului
- ε_0, ε_r este valorea permitivității vidului si cea relativă a mediului în care are loc încărcarea ionului

Această energie are valoare pozitivă, subliniind astfel caracterul nefavorabil energetic de a menține o sferă încărcată electrostatic cu sarcina *Q*, dat fiind fenomenul de repulsie electrostatică între cantitățile *dq* ce sunt aduse iterativ în procesul de încărcare pe suprafața sferei.

Utilizând ecuația de mai sus, putem deduce variația în energie liberă asociată cu transferul unui ion între două medii cu permitivități electrice relative diferite ($\varepsilon_{r1} < \varepsilon_{r2}$):

$$\Delta W = -\frac{Q^2}{8\pi\varepsilon_0 a}\left[\frac{1}{\varepsilon_{r1}} - \frac{1}{\varepsilon_{r2}}\right] \tag{5.7}$$

Această expresie este importantă atunci când vom discuta caracterul nefavorabil energetic al tranziției unor ioni implicați în procesele fiziologice celulare (e.g., Na^+, Ca^{2+}) dintr-un mediu apos ($\varepsilon_r = 80$) în interiorul membranei celulare.

Energia proprie a unui sistem dipolar se estimează ca fiind egală cu suma energiilor Born a sarcinilor ce constituie dipolul din care se scade energia electrostatică a celor două sarcini aranjate geometric ca un dipol.

Considerând că cele două sarcini (ioni) cu sarcina *q* au raze egale (*a*) iar dipolul format are lungimea *l* (l=2a), energia proprie a acestui dipol este dată de:

$$W_{dipol} = \frac{1}{4\pi\varepsilon_0\varepsilon_r}\left[\frac{q^2}{2a} + \frac{q^2}{2a} - \frac{q^2}{2a}\right] = \frac{q^2}{8\pi a \varepsilon_0 \varepsilon_r} \tag{5.8}$$

5.3. *Interacții polare. Hidratarea macromoleculelor*

Una dintre cele mai importante interacțiuni interatomice ce se manifestă la introducerea ionilor mono- sau multivalenți într-un solvent polar (în caz particu-

lar, apă) este interacţiunea tip 'ion-dipol'. Acest tip de interacţiune conduce la orientarea preferenţială a moleculelor de apă (cu caracter dipolar) în jurul ionilor solvataţi, favorizând acele direcţii ale vectorilor dipol orientate la $\theta = 0^\circ$ în raport cu ionii pozitivi (cationii) şi $\theta = 180^\circ$ în raport cu ionii negativi.

Astfel, în apă, şi ionii cu rol fiziologic (e.g. Li^+, Be^{2+}, Na^+, K^+, Ca^{2+}) au un anumit număr de molecule de apă ce interacţionează electrostatic cu ei şi sunt orientate preferenţial (radial) în jurul ionilor. Aceşti ioni se numesc ioni hidrataţi, iar numărul moleculelor de apă orientate preferenţial în imediata vecinătate a razei ionice se numeşte număr de hidratare. O altă mărime caracteristică ionilor solvataţi este raza de hidratare în apă, care este mai mare decât raza ionului în matricea cristalină a substanţei din care provine şi care reprezintă raza complexului ion hidratat, considerând pentru estimarea sa acele molecule de apă ce se constituie în numărul de hidratare.

În tabelul următor sunt date câteva estimări aproximative ale numărului de hidratare şi razei de hidratare ale câtorva ioni esenţiali în procesele biofizice:

Tabel 3. Estimări aproximative ale parametrilor de hidratare (raza de hidratare, număr de hidratare şi timp de viaţă al moleculelor hidratante) pentru cei mai importanţi ioni în procesele biofizice

Ion	Raza ionică cristalină (nm)	Rază de hidratare (nm)	Număr de hidratare (±1)	Timp de viaţă al moleculelor hidratante (s)
Li^+	0.068	0.38	5-6	10^{-9}-10^{-8}
Na^+	0.095	0.36	4-5	10^{-9}
K^+	0.133	0.33	3-4	10^{-9}
Cs^+	0.169	0.33	1-2	10^{-10}-10^{-9}
Be^{2+}	0.031	0.46	4	10^{-3}-10^{-2}
Ca^{2+}	0.099	0.41	6	10^{-8}
Cl^-	0.181	0.33	1	-
Br^-	0.195	0.33	1	-

Trebuie menţionat că energiile de hidratare (de interacţiune între ioni şi moleculele de apă din raza de hidratare) au valori considerabile; astfel, pentru ionii de sodiu şi clor, energiile de hidratare sunt de ordinul –105 kcal/mol (sodiu) şi respectiv –82 kcal/mol. După cum devine evident, aceste energii sunt comparabile în magnitudine cu valoarea energiei legăturilor covalente simple. În tabelul următor sunt exemplificate valorile energiei de hidratare pentru câteva specii de ioni.

Aceste valori semnificative ale energiilor de hidratare pot fi relativ uşor înţelese dacă se consideră structura dipolară a apei. Un formalism simplu utilizat

pentru a exprima cantitativ valorile energiilor de hidratare se bazează pe utilizarea conceptului de energie Born. Asa cum am discutat într-un capitol anterior, la transferul unui mol de ioni cu raza a, dintr-un mediu cu coeficientul de permitivitate relativa ε_{r1} în altul cu coeficientul de permitivitate relativă ε_{r2}, energia liberă asociată acestui transfer se poate estima după expresia:

$$\Delta G = \frac{z^2 e^2 N}{8\pi a \varepsilon_0}\left(\frac{1}{\varepsilon_{r2}} - \frac{1}{\varepsilon_{r1}}\right) \qquad (5.9)$$

În expresia de mai sus, z este valența ionului iar N este numărul lui Avogadro.

Tabel 4. Valorile energiei de hidratare pentru cele mai importante specii de ioni în procesele biofizice

Ion	Energie de hidratare (kcal/mol)
Li^+	-131
Na^+	-105
K^+	-85
Mg^{2+}	-476
Ca^{2+}	-397
Cl^-	-82
I^-	-65

Deci, transferul unui ion din vid ($\varepsilon_{r1} = 1$) în apă ($\varepsilon_{r2} = 80$) este asociat energetic cu o variație de energie liberă negativă; altfel spus, procesul este favorabil energetic iar energia 'eliberată' în cursul acestei tranziții se regăsește în energia de interacțiune ion-molecule de apă (energie de hidratare). Cu toate virtuțile acestui raționament simplu, estimări cantitative exacte ale energiei de hidratare trebuie să țină cont de faptul că, în imediata vecinătate a unui ion, coeficientul de permitivitate al apei este mult mai mic decât în restul soluției. Aceasta se datorește faptului că, în virtutea interacțiunilor ion-dipol, moleculele de apă din raza de hidratare sunt orientate spațial preferențial și deci mai dificil de re-orientat (polarizat) într-un câmp electric extern.

În figura următoare este reprezentat schematizat un ion înconjurat de moleculele de apă din raza de hidratare.

Noțiunea de energie de hidratare pentru un anumit ion este foarte importantă atunci când se are în vedere studiul de permeație a ionilor prin canale ionice; chiar și din considerentele exprimate până acum, rezultă că în constituția regiunii interne a canalului ionic trebuie să existe grupări aminoacidice dipolare care să substituie energetic moleculele de apă în procesul de difuzie ionică, în care,

inerent, o parte din moleculele de apă din raza de hidratare sunt 'pierdute' ('stripped off').

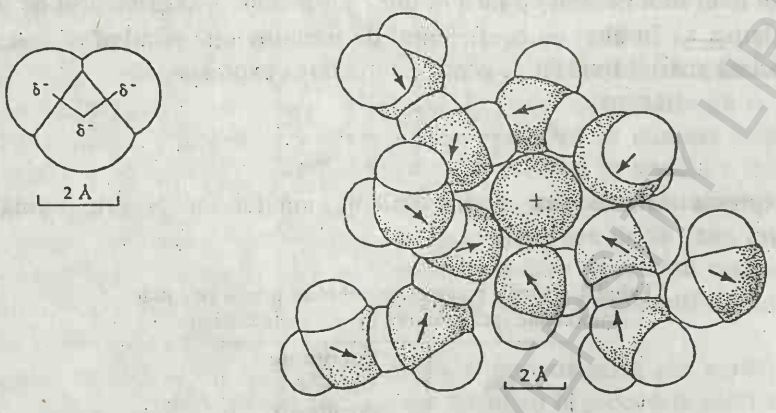


Fig.25. Dimensiunile geometrice comparative ale unei molecule de apă şi un ion pozitiv, complet hidratat. Prin săgeată s-a reprezentat direcţia şi sensul momentului de dipol al apei.

Cu toate că moleculele de apă din raza de hidratare interacţionează destul de puternic cu ionul hidratat, ele nu formează o structură rigidă în jurul ionului. Tendinţa moleculelor de apă de a interacţiona continuu prin legături de hidrogen, cumulată cu interacţiunea molecule de apă – ion hidratat, conferă în final configuraţie energetică minimă sistemului ion hidratat. Numărul moleculelor de apă din raza de hidratare precum şi orientarea acestora radial în jurul ionului se schimbă continuu, datorită fenomenelor de agitaţie termică. Utilizându-se măsurători de absorbţie a sunetului de înaltă frecvenţă, s-a măsurat rata de substituţie a moleculelor de apă din raza de hidratare; dacă pentru cazul interacţiunilor apă – apă această rată este de ordinul 10^{11} s^{-1}, în cazul complexului Na^+ - apă moleculele de apă din raza de hidratare se auto-substituie la fiecare 2-4 ns. Cu alte cuvinte, o moleculă de apă petrece un timp de câteva sute de ori mai mare în câmpul de forţă al ionului de sodiu decât în câmpul de interacţiune (prin legături de hidrogen) al altei molecule de apă. Experimental, numărul de hidratare al unui ion precum şi raza sa de hidratare pot fi deduse din măsurători de vîscozitate, conductivitate, solubilitate şi estimări spectroscopice ale soluţiilor diverşilor electroliţi.

BCU IAŞI UNIVERSITY LIBRARY

6. Proprietățile ATP-ului şi rolul său central în bioenergetică

Ca ramură ştiințifică independentă a biochimiei şi biofizicii moleculare, bioenergetica încearcă să explice modul în care organismele vii reuşesc să se mențină în stare energetică departe de echilibru. Detalierea moleculară a mecanismelor fizice, în scopul mai sus menționat, poate fi consultată în orice tratat nou de biochimie; în acest capitol este prezentată succint molecula de ATP precum şi explicarea rolului jucat de aceasta în procesele bioenergetice celulare.

Două din cele mai importante procese pentru care celulele au trebuit să găsească soluții în cursul evoluției, pentru a se menține în stare energetică departe de echilibru, sunt:

– extracția energiei din mediul înconjurător.
– sinteza blocurilor funcționale ale macromoleculelor constituente.

Aceste două procese au loc într-un sistem integrat de reacții chimice, care sunt cunoscute sub denumirea de metabolism celular.

În cazul eucariotelor, există două locații celulare distincte unde are loc procesul de conversie a energiei din mediul înconjurător:

1. **cloroplastele**, ce se întâlnesc exclusiv în organismele fotoautotrofe;
2. **mitocondriile**, ce se găsesc în toate celulele organismelor chemotrofe.

Proprietatea structurală comună a cloroplastelor şi mitocondriilor este subdivizarea lor în două 'faze' constitutive:

– o fază care este reprezentată de un sistem membranos superior, denumită **tilacoid**, în cazul celulelor fotoaototrofe, şi **criste** în cazul chemotrofelor;
– cealaltă fază care are aparență de gel, cu proprietăți de organizare mult mai puțin aparente, şi care se numeşte **stromă** în cazul celulelor fotoautotrofe şi **matrice** în cazul mitocondriilor.

În tilacoide şi criste au loc procesele bioenergetice fundamentale ce duc la extragerea energiei necesare pentru toate procesele endoenergetice celulare şi care sunt catalizate de enzime specifice localizate în stromă şi matrice.

BCU "LUCIAN BLAGA" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Este fundamental de reţinut că, în cursul reacţiilor bioenergetice, energia sintetizată nu este cuplată direct cu procese şi reacţii biologice endoenergetice; dimpotrivă, celulele au permis dezvoltarea unui sistem separat utilizat în satisfacerea nevoilor sale energetice şi care este reprezentat de molecule macroergice, prin a căror hidroliză se pune în libertate energia necesară desfăşurării reacţiilor endoenergetice celulare. Cel mai important reprezentat al acestor molecule macroergice este adenozin trifosfatul (ATP), iar rolul moleculei de ATP în schimburile energetice celulare a fost recunoscut încă din 1941 de către Fritz Lipmann şi Herman Kalckar.

Molecula de ATP este constituită din trei părţi: o grupare de adenină, un reziduu de d-riboză ataşat de adenină şi trei grupări tip fosfat (Fig. 26).

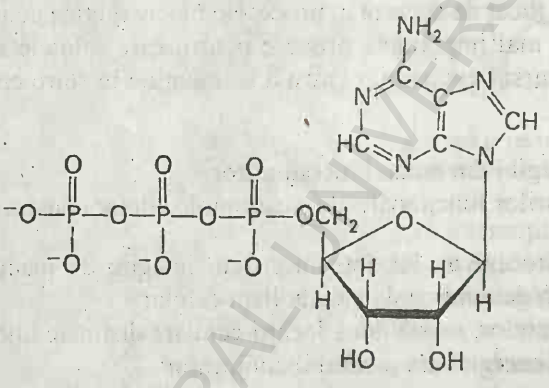


Fig. 26. Structura simplificată a moleculei de adenozin-trifosfat (ATP)

Compuşii moleculari cu doar unul sau două grupări fosfat se numesc adenozin monofosfat (AMP) respectiv adenozin difosfat (ADP).

În condiţii fiziologice normale, ATP-ul se comportă ca un ion cu sarcina netă negativă (-4e$^-$) şi care se complexează foarte uşor cu ioni divalenţi (Mg^{2+}, Ca^{2+}). În cea mai întâlnită stare activă, ATP-ului este complexat preponderent cu ioni de Mg^{2+} sau Mn^{2+}.

Reacţia de hidroliză a ATP-ului în ADP şi un rest fostat (sau a ATP-ului în AMP şi un rest pirofosfat sau a ADP-uli în AMP şi un rest fosfat) este exoenergetică şi dependentă de valoarea pH-ului mediului în care are loc. La pH 7, reacţia de hidroliză a ATP-ului în ADP are loc astfel:

$$ATP^{4-} + H_2O \rightarrow ADP^{3-} + HPO_4^{2-} + H^+ \quad (6.1)$$

Variaţia de energie liberă a acestei reacţii este $\Delta G^0 = -31$ kJ/mol.

Unul dintre cele mai importante motive, de ordin structural, pentru care molecula de ATP este hidrolizabilă cu eliberare de energie, rezidă în proprietățile sale electrostatice: după cum menționam mai sus, la pH 7 ATP-ul are 4 sarcini negative care interacționează repulsiv apreciabil, datorită situării lor relative la distanțe mici. În consecință, această energie de repulsie este mult redusă în cazul în care unul sau mai multe grupări fosfat sunt eliberate în soluție în timpul reacției de hidroliză a ATP-ului, iar diferența energetică între starea hidrolizată (ADP sau AMP) a ATP-ului și starea sa inițială se regăsește în formula de energie de transfer utilizabilă pentru alte reacții celulare.

Pentru a înțelege modul în care energia eliberată la hidroliza ATP-ului este utilizată în 'alimentarea' reacțiilor celulare endoenergetice, să considerăm următorul exemplu:

Să presupunem ca energia liberă în condiții standard de conversie a moleculei A în molecula B este +4 kJ/mol.

$$A \Leftrightarrow B$$
$$\Delta G^{0'} = +4(kJ/mol) \tag{6.2}$$

Relația de legătură între $\Delta G^{0'}$ și constanta de echilibru a reacției de mai sus la 25^0 C este:

$$K'_{eq.} = \frac{[B]_{eq.}}{[A]_{eq.}} = 10^{-\frac{\Delta G^{0'}}{1.36}} = 1.15 \times 10^{-3} \tag{6.3}$$

Astfel, A nu se poate transforma spontan în B în condițiile în care raportul concentrațiilor molare a moleculelor B și respectiv A este mai mare sau egală cu 1.15×10^{-3}. Pentru ca reacția de conversie a lui A în B să decurgă spontan în condiții standard, trebuie ca $\Delta G^{0'} < 0$. Cu toate acestea, reacția de mai sus devine posibilă atunci când este cuplată cu reacția de hidroliză a ATP-ului, după schema de mai jos:

$$A + ATP^{4-} \rightarrow ADP^{3-} + A - P_i$$
$$A - P_i \Leftrightarrow B + P_i \tag{6.4}$$

Ținând cont de faptul că variația de energie liberă standard de hidroliză a ATP-ului este –7.3 kJ/mol, constanta de echilibru a reacției de mai sus (în condiții standard) este dată de:

$$K_{eq.} = \frac{[B]_{eq.}}{[A]_{eq.}} \frac{[ADP]_{eq.}[P_i]_{eq}}{[ATP]_{eq.}} = 2.67 \times 10^2 \tag{6.5}$$

iar variația de energie liberă în condiții standard este $\Delta G^{0'}$ = -3.3 kJ/mol.

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

În legătură cu schema generală prezentată mai sus, trebuie reținut următorul aspect: energia eliberată la hidroliza ATP-ului poate fi utilizată pentru derularea reacțiilor celulare endoenergetice datorită cuplării energetice cu acele reacții printr-un *intermediar fosforilat comun*, care în exemplul de mai sus este reprezentat de A-P_I. Practic *toate* reacțiile de biosinteză (sinteza polizaharidelor, a ADN-ului, a ARN-ului) din celulele vii au loc în acest fel. Biosinteza proteică consumă aproape 90 % din energia eliberată la hidroliza ATP-ului. În cazuri tipice, o moleculă de ATP este 'consumată' în decursul unui minut de la formarea sa; un adult consumă aproape 70 kg de ATP în 24 de ore, iar tot conținutul de ATP al bacteriei *E. coli* este suficient pentru reacții de biosinteză timp de doar 2 secunde. Deducem de aici că 'prețul plătit' de organismele celulare pentru a se menține în viață, în stare termodinamică de neechilibru, este de a produce continuu ATP în cursul proceselor de fotosinteză sau chemosinteză.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Aici

7. Structura şi compoziţia biomembranelor

Membranele celulelor biologice sunt structuri ce izolează fiecare celulă vie de mediul înconjurător, definind astfel compoziţia moleculară intracelulară şi menţinând diferenţe esenţiale între compoziţia mediului intracelular şi cel extracelular. Membrana oricărei celule vii reprezintă un element de filtrare foarte selectiv pentru ionii şi moleculele implicate în procese celulare specifice şi constituie matricea proceselor celulare de transport activ de substanţă; ea controlează procesele de intrare a nutrienţilor în celulă şi de eliminare a produşilor neutilizabili, generează diferenţe de concentraţii ionice între mediul intracelular şi extracelular, acţionează ca un senzor al semnalelor celulare externe, participând astfel în procesele de comunicare celulară.

În cazul celulelor eucariote, existenţa structurilor membranare este extinsă şi la mediul intracelular, constituind un element definitoriu spaţial şi funcţional al unor organe celulare specifice, cum ar fi: mitocondrii, cloroplaste şi lizozomi.

Cu toate că una din caracteristicile definitorii ale celulelor şi organelelor lor este *diversitatea* funcţională şi structurală, biomembranele au anumite trăsături *comune*, cum ar fi:

- sunt structuri planare, cu grosimi moleculare între 60 şi 100 Å şi care formează bariere închise în jurul mediilor pe care le individualizează spaţial
- sunt alcătuite în principal din lipide şi proteine. Raportul de greutate molară între proteine şi lipide din compoziţia biomembranelor este variat, având valori în domeniul 1:4 ÷ 4:1
- proteinele membranare sunt structurile esenţiale implicate în înzestrarea biomembranelor cu funcţii specifice. Aceste proteine servesc drept pompe moleculare şi ionice membranare, receptori, enzime, elemente de conversie a energiei.
- sunt supra-structuri moleculare necovalente. Starea de energie minimă a structurilor biomembrană-proteine este dată de implicarea cooperativă a interacţiunilor necovalente (cum ar fi forţele van der Waals, interacţiunile electrostatice sau legăturile de hidrogen)
- sunt asimetrice; ele sunt constituite din două membrane suprapuse, iar conţinutul lipidic al fiecărei mono-membrane este individualizat

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- sunt structuri fluide; moleculele lipidice şi proteinele constituente difuzează rapid în planul membranei. Trebuie reţinut însă că rotaţia lipidelor sau proteinelor în planuri perpendiculare pe planul membranei este aproape absentă.

'Cărămizile' de bază ale alcătuirii membranelor biologice le constituie, după cum indicam şi mai sus, lipidele.

Lipidele sunt molecule insolubile în apă dar care sunt uşor dizolvate de către solvenţi organici. Ele constituie aproximativ 50 % din masa membranelor celulelor animale şi au o densitate de aproximativ 5×10^6 lipide pe 1 μm^2 arie de membrană. Cele mai importante clase de lipide întâlnite în constituirea biomembranelor sunt:

- fosfolipidele (cele mai întâlnite)
- colesterolul
- glicolipidele

Caracterul biochimic comun al acestor lipide, factor determinant al modului de auto-organizare a biomembranelor, este cel de amfifaticitate; altfel spus, lipidele au un capăt structural cu proprietăţi hidrofile şi altul hidrofob.

Fosfolipidele sunt fie derivaţi ai glicerolului (alcool simplu), fie ai sfingosinei (alcool complex). Mai jos, este reprezentat schematic modelul molecular simulat al unei fosfolipide.

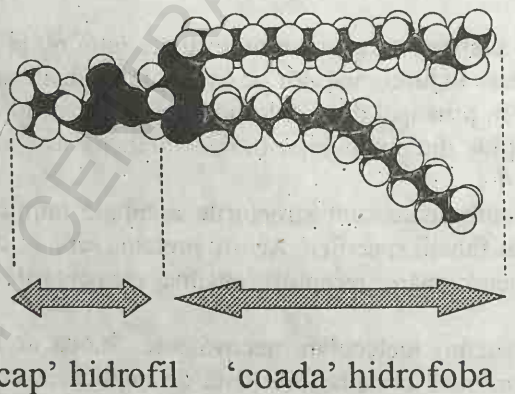


Fig. 27. Modelul 'space filling' al unei molecule lipidice de fosfatidilcolină (PC)

Cum este reprezentat, o moleculă tipică fosfolipidică are un capăt polar şi două 'cozi' ('tails') hidrofobe hidrocarbonate. Cozile hidrocarbonate diferă în

BCU IAŞI "CAROL I" UNIVERSITY LIBRARY

lungime (conţin între 14 şi 24 atomi de carbon), iar una din ele este nesaturată (are una sau mai multe legături duble *cis*). Lungimea precum şi caracterul saturat (sau nesaturat) al lipidelor biomembranelor sunt factori ce determină, nemijlocit, abilitatea lipidelor de a interacţiona între ele, influenţând deci fluiditatea membranelor.

Numeroase studii biochimice şi biofizice au arătat că membrana celulelor eucariote conţine patru tipuri majore de fosfolipide: **fosfatidilcolina, sfingomileina, fosfatidilserina şi fosfatidiletanolamina**. (Fig. 28)

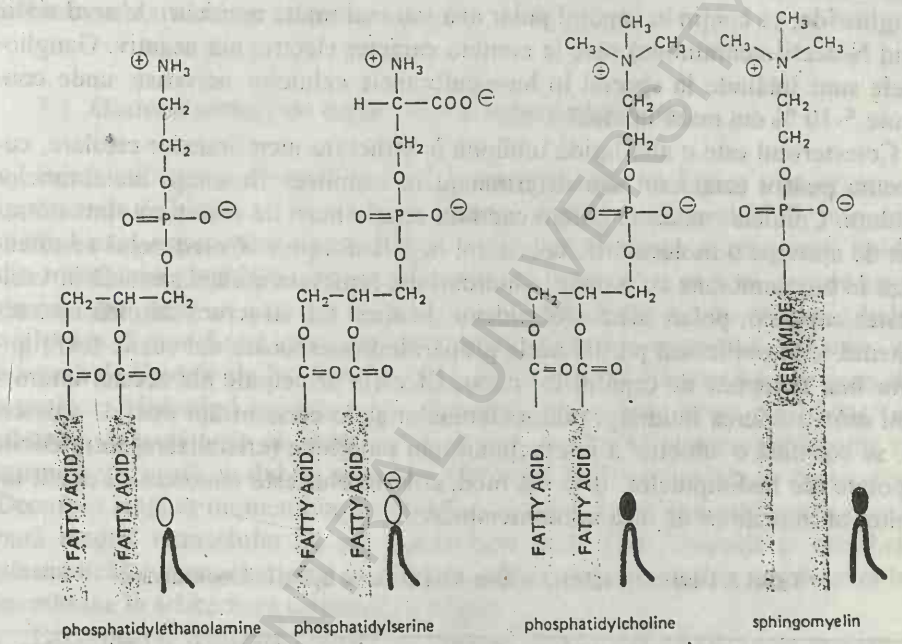


Fig. 28. Reprezentarea structurală planară a celor patru tipuri majore de fosfolipide ce intră în compoziţia biomembranelor celulelor eucariote [*Biochemistry (4th edition), 1995. Stryer, L.*]

Trebuie reţinut că dintre aceste tipuri de fosfolipide, doar fosfatidilserina are caracter electric net, negativ, diferit de zero; celelalte trei sunt încărcate neutru, având în condiţii de pH 7 capătul polar complet disociat, cu o sarcină pozitivă şi una negativă.

Glicolipidele sunt lipide ce conţin în capătul lor polar molecule de zahăr (glucoza sau galactoza) şi prezintă cea mai mare şi consistentă asimetrie, în ceea ce priveşte distribuţia în membrana celulară animală. Ele sunt întâlnite exclusiv în partea externă a membranelor cu gruparea de zahăr expusă pe suprafaţa celulară.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Glicolipidele sunt întâlnite în aproape toate membranele celulelor animale şi, procentual, ele reprezintă aproape 5 % din conţinutul total de lipide ce formează partea externă a acestor biomembrane. În bacterii şi în celulele vegetale, aproape toate glicolipidele sunt derivaţi ai glicerol-lipidelor (în particular, fosfatidilcolina). În celulele animale, glicolipidele reprezintă în mare majoritate derivaţi ai sfingomielinei. În membrana celulară a procariotelor şi eucariotelor sunt întâlnite mai ales glicolipide neutre, al căror capăt polar conţine de la 1 la > 15 molecule de zahăr neutre. Cea mai complexă clasă de glicolipide este constituită din **gangliosi**de, ce conţin în capătul polar una sau mai multe reziduuri de **acid sialic** (acid N-acetil-neuraminic) care le conferă caracter electric net negativ. Gangliosidele sunt întâlnite în special în biomembranele celulelor nervoase, unde constituie 5-10 % din masa lipidică.

Colesterolul este o altă lipidă întâlnită în structura membranelor celulare, cunoscută pentru caracterul său determinant în stabilirea fluidităţii membranelor celulare. Celulele eucariote conţin cantităţi relativ mari de colesterol, într-un raport de aproape o moleculă de colesterol la 5 fosfolipide. Colesterolul se orientează în biomembrane cu grupările hidroxil din structura inelară steroidă în vecinătatea capetelor polare ale fosfolipidelor. În acest fel, structura steroidă interacţionează şi imobilizează parţial acele grupări hidrocarbonate din cozile fosfolipidelor mai apropiate de capătul lor polar. Efectele principale ale acestei interacţiuni sunt: scăderea fluidităţii biomembranelor şi, la concentraţii mari de colesterol, se constată o inhibiţie a interacţiunii mai puternice (cristalizare) între cozile nepolare ale fosfolipidelor. În acest mod, colesterolul este cunoscut ca agent inhibitor al tranziţiilor de fază în biomembrane.

Tabel 5. Distribuţia relativă a diferitelor clase de lipide în biomembrane

	Biomembrana celulelor din ficat	Biomembrana eritrocitelor	Mielina	Biomembrana mitocondriilor	Biomembrana *E. coli*
Colesterol	17	23	22	3	0
Fosfatidiletanolamina	7	18	15	35	70
Fosfatidilserina	4	7	9	2	f. mic
Fosfatidilcolina	24	17	10	39	0
Sfingomielina	19	18	8	0	0
Glicolipide	7	3	28	f. mic	0
Alte lipide	22	13	8	21	30

* valorile din tabel reprezintă procente de masă, raportate la masa totală a lipidelor constituente

Suplimentar, colesterolul diminuează permeabilitatea biomembranelor pentru mici molecule hidrosolubile şi conduce, de asemenea, la creşterea flexibilităţii şi a stabilităţii mecanice a biomembranelor. Importanţa acestuia pentru stabilirea calităţii optime mecanice a biomembranelor a fost demonstrată de celule mutante, cărora le-a fost suprimată genetic capacitatea de a sintetiza colesterol. S-a constatat că membrana acestor celule se dislocă mecanic foarte facil, iar prezenţa colesterolului devine o necesitate pentru supravieţuirea celulelor respective.

În tabelul 5 este prezentată distribuţia relativă (*) a diferitelor clase de lipide în biomembranele unor celule.

7.1. *Modelul bistrat de organizare a biomembranelor*

Prima indicaţie a faptului că lipidele membranelor biologice sunt organizate în structura de bistrat a fost sugerată experimental încă din anul 1925, prin intermediul unui experiment foarte simplu şi elegant. În acest experiment, lipidele din membrana globulelor roşii au fost extrase cu acetona şi apoi expuse pe suprafaţa apei dintr-un vas special construit, a cărui suprafaţă de separaţie lichid-aer putea fi modificată continuu, în termeni de arie a suprafeţei. Ulterior, aria ocupată de lipidele de la suprafaţa apei a fost modificată continuu în sens descrescător, până când lipidele s-au organizat într-un film mono-molecular (monostrat). Măsurătorile au demonstrat că aria acestui film mono-molecular este aproximativ egală cu dublul ariei celulelor roşii din care lipidele au fost extrase. Deoarece singura biomembrană constituentă a celulelor roşii este aceea care separă mediul intracelular de cel extracelular (mai este denumită şi membrană plasmatică), s-a concluzionat că lipidele sunt organizate în structura acestei biomembrane în arhitectura continuă de bistrat.

Experimente realizate ulterior cu ajutorul altor metode fizice, mai precise, au confirmat pe deplin structura de bistrat a biomembranelor; de exemplu, experimente de difracţie cu raze X au demonstrat că membrana de mielină ce este organizată în jurul axonilor şi care are rol în modularea vitezei de propagare a influxurilor nervoase are structura de bistrat lipidic. Experimente de microscopie electronică tip 'freeze fracture', în care celule sau fragmente membranare sunt răcite rapid la temperatura azotului lichid şi apoi 'fracturate' prin coliziunea membranei cu un cuţit de microtom, au arătat că membranele biologice se 'despică' în lungul planului membranar, exact la mijlocul grosimii membranei (Fig. 29), dând naştere la două monostraturi lipidice.

Am prezentat într-un paragraf precedent unul din modurile posibile de autoorganizare a moleculelor lipidice într-un mediu apos, şi anume cel de micele.

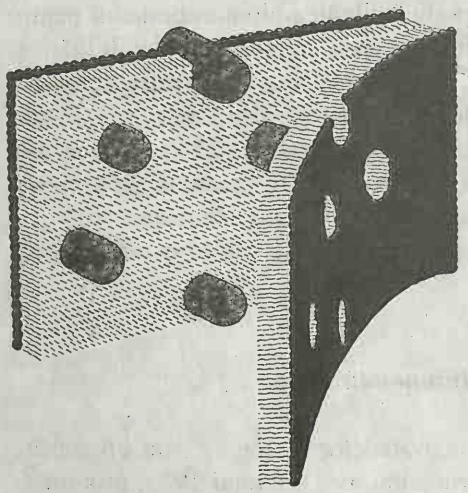


Fig. 29. Vizulalizarea celor două monostraturi lipidice ale unei biomembrane, prin metoda de microscopie electronică cuplată cu tehnica *'freeze-fracure'* (vezi în text). 'Găurile' din unul dintre monostraturi reprezintă locațiile de imersie ale proteinelor integrale (reprezentate în celălalt monostrat), înainte de înghețarea bistratului lipidic. [*Biochemistry (4th edition), 1995. Stryer, L.*]

Celălalt mod de auto-organizare al lipidelor, care să dea naştere unei structuri cu energie minimă, este de bistrat lipidic. De fapt, structura de auto-organizare 'favorită' a majorității fosfolipidelor şi glicolipidelor într-un mediu apos este de bistrat lipidic, şi nu de micele. Aceasta este o consecință ce decurge din considerente de stericitate, deoarece cozile hidrofobe ale acestor lipide au dimensiuni geometrice prea mari pentru a încăpea în interiorul unei structuri micelare, spre deosebire de sărurile unor acizi graşi – ex. palmitat de sodiu – ce sunt ingredienți de bază ai unor săpunuri, care conțin în coada hidrofobă doar un singur lanț hidrocarbonat, dimensionat corespunzător formării micelelor.

După cum subliniam mai sus, formarea unui bistrat lipidic este eminamente un proces *spontan*, de *auto-or-*

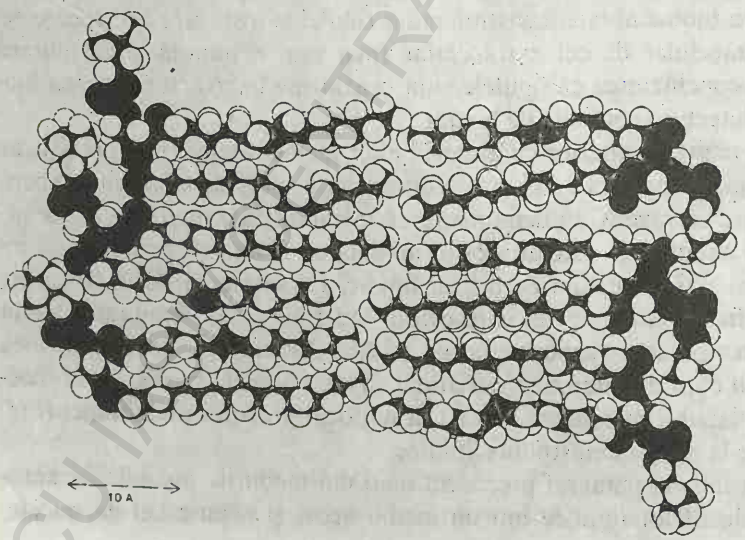


Fig. 30. Reprezentarea moleculară simulată a unui bistrat lipidic

ganizare, care apare datorită proprietăţii intrinseci de amfifaticitate a lipidelor. Structura generală a unui bistrat lipidic este reprezentată în Fig. 30.

Cea mai importantă interacţiune ce favorizează organizarea spontană a moleculelor lipidice în bistrat este interacţiunea hidrofobă.

Trebuie menţionat aici un lucru foarte important: caracterul de hidrofobicitate al unor molecule, şi în special al lipidelor, nu trebuie să fie asociat cu existenţa unei 'forţe' hidrofobe, care derivă dintr-un 'câmp' hidrofob. Hidrofobicitatea se referă exclusiv la maniera de auto-organizare a moleculelor cu proprietăţi amfifatice (în particular al lipidelor), în care moleculele se structurează spaţial în aşa fel încât cozile hidrocarbonate evită contactul cu mediul apos. Forţele implicate în procesul de auto-organizare al lipidelor sunt: forţele de interacţiune van der Waals între cozile hidrocarbonate (hidrofobe) ale lipidelor, forţele de interacţiune electrostatică între capetele polare ale lipidelor şi moleculele de apă şi forţele tip 'legătură de hidrogen' între capetele polare şi moleculele de apă. Această inter-corelare de interacţiuni multiple favorizează fenomenul de hidrofobicitate şi mediază formarea bistraturilor lipidice, ca structuri unitare şi în stare de energie minimă. Forţele covalente nu sunt implicate în realizarea unei structuri de bistrat lipidic, astfel încât fluiditatea membranară reprezintă una din proprietăţile inerente ale biomembranelor.

Datorită faptului că permitivitatea electrică relativă a regiunii interne a unui bistrat lipidic este foarte mică (~ 2) în comparaţie cu permitivitatea relativă a apei (~ 80), ionii, precum şi alte molecule încărcate electric (sau cu caracter dipolar), nu penetrează *per se* membrana celulară. Excepţie de la această regulă fac moleculele de apă, care datorită dimensiunii relativ mici, penetrează facil bistraturile lipidice prin zonele 'poroase' ale acestora. Trebuie să ne reamintim că bistratul lipidic este o structură dinamică, şi există anumite conformaţii geometrice ale acestei structuri ce apar datorită fluctuaţiilor termice, în care prezenţa aşa-numitelor defecte de structură facilitează difuzia moleculelor polare mici, cum ar fi apa (vezi mai jos). Transportul moleculelor de apă prin bistraturile lipidice în faza fluidă este foarte eficient, astfel încât într-o secundă, printr-o arie egală cu 1 cm^2, difuzează aproximativ 10^{-3} grame de apă, ceea ce corespunde unui coeficient de permeabilitate de $P \sim 10^{-3}$ cm/s. În faza cristalină a bistraturilor lipidice, coeficientul de permeabilitate al apei descreşte de aproximativ trei ori.

Abia în anul 1970, cercetătorii au stabilit că bistratul lipidic este un fluid bidimensional, în sensul că moleculele lipidice pot difuza liber în volumul bistratului. Experimente de rezonanţă electronică de spin ('ESR spectroscopy'), în ca-

re capătul polar al unor lipide constituente ale bistratului sunt 'marcate' cu un 'label' (marcator) de spin (grupare nitroxil –are un electron liber, şi poate da naştere unui semnal paramagnetic), au fost utilizate pentru a deduce mişcarea şi orientarea lipidelor într-un bistrat lipidic. Acest tip de experimente, realizate pe membrane lipidice artificiale, au demonstrat că moleculele lipidice migrează foarte rar de pe un monostrat pe un altul din structura membranei sintetice. Acest proces, denumit 'flip-flop', are loc într-o perioadă de aproximativ o lună; pe de altă parte, moleculele lipidice difuzează cu facilitate sporită în planul membranei, cu un coeficient de difuzie laterală de ~ 10^{-8} cm^2/s. Aceasta înseamnă că, în medie, o moleculă lipidică traversează întreaga suprafață a unei bacterii în aproape o secundă.

În tabelul următor sunt prezentate valorile coeficienților de difuzie laterală (în planul membranei) ale unor molecule de probă (lipide sau proteine) în diferite structuri organizate de biomembrane.

Tabel 6. Valorile coeficienților de difuzie laterală ale unor molecule de probă (lipide sau proteine) în diferite structuri organizate de biomembrane:

Sistemul biomembranar	Proba (lipida sau proteina)	Coeficient de difuzie laterală ($D_{lat.}$) (cm^2/s)	Temperatura (°C)
DMPC	Pyten-lecithin N-4-nitrobenzene-2-oxa-1,3-diazophosphatidylethanol amine	0.65×10^{-7}	30
DMPC/Colesterol	DiO_{18}	5×10^{-9}	15
Eritrocite	Pyrene-lecithin	1×10^{-7}	30
Glycophorin + DMPC (lipozomi)	Glycophorin	10^{-8}	$T > T_{\text{tranziție de fază}}/30$

După cum se va prezenta în capitolele următoare, procesele de difuzie membranară laterale au semnificație deosebit de importantă în exercitarea funcțiilor caracteristice ale biomembranelor; majoritatea mecanismelor biofizice ce fundamentează funcționarea caracteristică a unei biomembrane au la bază interacțiuni între diferite proteine (lipide) membranare şi alte sisteme moleculare, mai ales proteice, exogene sau endogene, iar aceste interacțiuni sunt condiționate de contactul fizic între moleculele amintite.

Experimente suplimentate de spectroscopie ESR au arătat că moleculele lipidice se rotesc relativ repede în jurul axei lor longitudinale, şi că grupările hidrocarbonate sunt flexibile cu grad maxim de flexibilitate în apropierea centrului bistratului (Fig. 31).

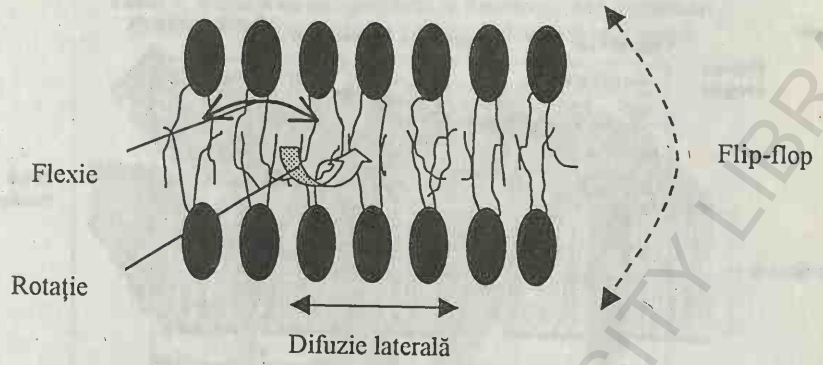


Fig. 31. Tipurile posibile de mişcare a moleculelor de fosfolipide într-un bistrat lipidic

7.2. *Modele de organizare a proteinelor în biomembrane*

Deşi structura de bază a biomembranelor este conferită de organizarea ordonată, bi-dimensională a moleculelor lipidice, marea majoritate a funcţiilor membranelor biologice este îndeplinită de proteinele membranare. Determinări cantitative ale concentraţiilor proteinelor în biomembrane au demonstrat că există o mare variabilitate de distribuţie a acestora în bistratul pipidic: astfel, în teaca de mielină din jurul axonilor celulelor nervoase, mai puţin de 25 % din conţinutul masic este datorat proteinelor, pe când în membranele interne ale cloroplastelor şi mitocondriilor aproximativ 75 % din masa membranară o reprezintă structurile proteice. Pentru marea majoritate a celulelor, membrana bi-lipidică conţine aproximativ 50 % proteine; determinări experimentale corelate cu estimări statistice au stabilit că, ţinând cont de diferenţa de dimensiune între lipide şi proteine, la fiecare moleculă proteică membranară îi corespund aproximativ 50 molecule lipidice. Cea mai simplă metodă de determinare a conţinutului proteic al unei membrane biologice este electroforeza pe gel de poli-acrilamidă cu SDS (sodium-dodecyl-sulphate).

Multe proteine membranare sunt profund inserate în bistratul lipidic, traversându-l dintr-o parte în alta; aceste proteine (Fig. 32) au caracter amfifatic, în sensul că regiunile ce traversează membrana sunt hidrofobe, putând interacţiona favorabil energetic cu miezul hidrofob al membranelor biologice, iar regiunile expuse mediului apos (din ambele părţi ale membranei) au caracter hidrofil.

Caracterul de hidrofobicitate al unora din aceste proteine este accentuat şi de prezenţa unor lanţuri de acizi graşi, ataşate covalent de blocul proteic, şi care interacţionează prin forţe van der Waals cu miezul hidrofob al bimembranelor.

BCU CLUJ UNIVERSITY LIBRARY

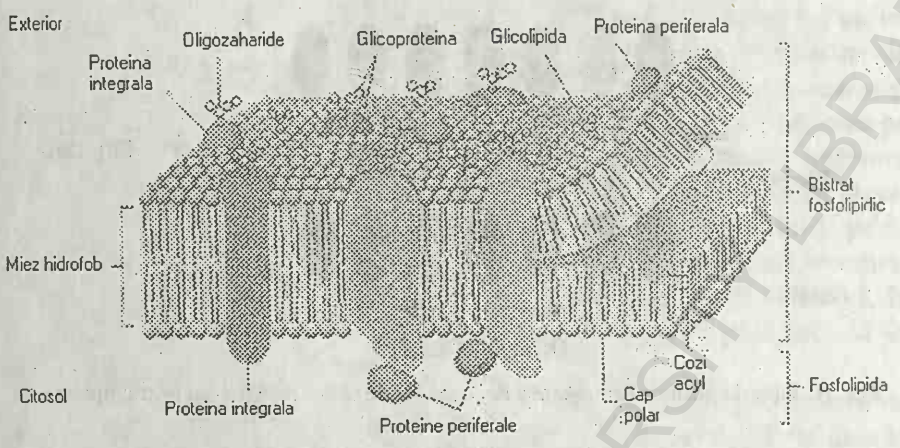


Fig. 32. Reprezentarea schematică a constituenţilor moleculari proteici principali ai unei biomembrane: monostraturile lipidice, proteinele integrale, proteinele periferice, glicoproteine, glicolipide, oligozaharide [*Luchian, T. 1997., Ph. D. Thesis, Graz*]

Acest tip de proteine, care au regiuni structurale ce interacţionează direct cu regiunea internă, hidrofobă, a unui bistrat lipidic, se numesc **proteine integrale** ('integral proteins').

Există şi o altă categorie de proteine membranare care nu interacţionează cu mediul intern al bistratului lipidic, şi care sunt ataşate de o parte sau alta a membranei prin intermediul interacţiunilor electrostatice sau de hidrogen. Aceste proteine se numesc **proteine membranare periferice** ('peripheral proteins'). În cazul proteinelor integrale, regiunea polipeptidică ce interacţionează direct cu miezul hidrofob al membranei este constituită din aminoacizi ce au drept reziduuri grupări moleculare nepolare. Pentru a exista în stare conformaţională cu energie minimă, şi a maximiza numărul legăturilor de hidrogen ce se stabilesc între legăturile peptidice, regiunea polipeptidică inserată în bistrat are conformaţie de α-helix.

În cazul multor proteine cu structură primară cunoscută, deseori se pune problema de a identifica acele regiuni care se găsesc în interiorul membranelor lipidice cu cea mai mare probabilitate. În esenţă, primul pas pentru a da răspuns la această întrebare este de a calcula variaţia de energie liberă la transferul unui domeniu α-helix din structura primară a proteinei din interiorul membranei în apă. Pentru aminoacizii consideraţi individual, această variaţie de energie liberă este dată în tabel 7:

BCU Cluj / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabel 7. Variaţia de energie liberă la transferul unor aminoacizi (consideraţi individuali) din interiorul biomembranei în apă

Aminoacid	$\Delta G_{miez\ hidrofob-apă}$ (kcal/mol)
Phe	3.7
Met	3.4
Ile	3.1
Leu	2.8
Val	2.6
Cys	2.0
Trp	1.9
Ala	1.6
Thr	1.2
Gly	1.0
Ser	0.6
Pro	-0.2
Tyr	-0.7
His	-3.0
Gln	-4.1
Asn	-4.8
Glu	-8.2
Lys	-8.8
Asp	-9.2
Arg	-12.3

Consultând acest tabel, rezultă limpede că, de exemplu, transferul unui lanţ polipeptidic format din arginina din miezul hidrofob al membranei în apă este foarte favorabil ($\Delta G < 0$), pe când transferul unuia format din fenilalanină este nefavorabil energetic ($\Delta G > 0$).

Ştiind că grosimea miezului hidrofob al membranei lipidice este de ~ 30 Å, se deduce că numărul minim de aminoacizi al unui α-helix integral este de 20 aminoacizi. Apoi, se calculează variaţia de energie liberă la transferul unui domeniu α-helix din structura primară a proteinei de studiu ce începe cu aminoacidul 1 până la 20; acelaşi calcul se face pentru următorul domeniu, ce începe cu aminoacidul 2 şi se termină cu cel din poziţia 21 ş.a.m.d. Cu aceste date se reprezintă **graficul de hidropatie**, în care pe abscisă este reprezentată poziţia primului reziduu aminoacidic din fereastra ('window') de 20 aminoacizi consideraţă pentru calcul, iar pe ordonată variaţia de energie liberă la transferul acelui domeniu din miezul lipidic în apă. Regula general acceptată este că o variaţie de energie liberă cel puţin egală cu + 20 kcal/mol din graficul de hidropatie identifică un segment polipeptidic care ar putea fi parte integrală al respectivei proteine.

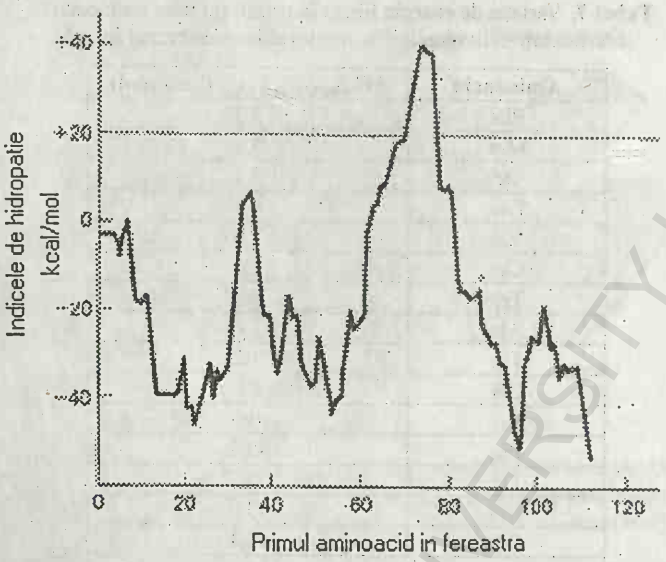


Fig. 33. Utilizarea graficului de hidropatie pentru identificarea domeniilor polipeptidice integrale din structura unei proteine

Trebuie însă reținut că *graficul de hidropatie este util în a sugera care domenii din proteină sunt regiuni integrale; teste ulterioare sunt necesare pentru a proba pe deplin aceste sugestii primare.*

Un alt criteriu folosit în stabilirea categoriei din care face parte o anumită proteină membranară (categoria proteinelor integrale sau periferice), şi care este indisolubil legat de mecanismul său de interacțiune cu membrană biologică, este modul de solubilizare al acestor proteine membranare.

În general proteinele membranare integrale sunt solubilizate doar cu utilizarea detergenților, care, datorită proprietăților lor amfifatice, degradează interacțiunile hidrofobe ale proteinelor cu interiorul hidrofob al biomembranelor şi distrug practic membrana biologică respectivă. Cei mai utilizați detergenți folosiți pentru izolarea proteinelor integrale sunt SDS (sodium dodecyl sulfat – cu caracter anionic) şi Triton X-100 (detergent ne-ionic).

Proteinele periferice sunt izolate din biomembrane prin procedee experimentale mai simple, cum ar fi expunerea membranei biologice în soluții fiziologice cu valori extreme, mult depărtate de valorile fiziologice, ale pH-ului şi tăriei ionice; datorită caracterului electrostatic al interacțiunilor între proteinele membranare şi biomembrană, modificarea considerabilă a unora din proprietățile fizice

ale mediului în care au loc aceste interacţiuni (i.e., pH-ul şi tăria ionică) influenţează direct tăria acestor legături (vezi teoria Debye-Hückel) şi conduce la sedimentarea acestora în soluţie.

7.3. *Modele de organizare a moleculelor de carbohidraţi în biomembrane*

Toate celulele eucariote au lanţuri carbohidratate la suprafaţa externă, constituite ca structuri de oligozaharide sau polizaharide legate covalent de proteinele membranare sau ca structuri de oligozaharide legate covalent de lipidele biomembranei (glicolipide). Totalul moleculelor de carbohidraţi reprezintă între 2 şi 10 % din masa totală a biomembranelor. Distribuţia moleculelor de carbohidraţi este foarte asimetrică în ceea ce priveşte substratul (lipide sau proteine) de care sunt ataşate în biomembrane. Astfel, cu toate că procentul de lipide în biomembrane este mai mare decât procentul proteine, ceea ce înseamnă că există mai multe molecule de lipide decât proteine care au lanţuri de carbohidraţi ataşate, există un procentaj mai mare de carbohidraţi legaţi de proteinele membranare. Există două modalităţi de ataşare covalentă a lanţurilor de carbohidraţi pe proteinele membranare: legate la atomul de azot al aminoacidului asparagină ('N-linked') sau la atomul de oxigen al serinei sau treoninei ('O-linked').

Aşa cum am discutat în capitolele anterioare, biomembranele au caracter de asimetricitate în ceea ce priveşte distribuţia claselor de lipide în cele două monostraturi; suplimentar, acest caracter este menţinut şi în privinţa distribuţiei de lanţuri de carbohidraţi ataşate de lipide sau proteine care sunt distribuite exclusiv în partea ne-citoplasmatică a unei celule unde formează o zonă specifică, numită **glicocalix**. Această regiune poate fi uşor vizualizată prin tehnici de biologie celulară, în care celulele sunt tratate cu un colorant special numit roşu de ruteniu. Deşi în mare parte glicocalix-ul este format din lanţurile de carbohidraţi (în Fig. 33, 'sugar residues') ataşaţi pe proteinele membranare sau pe lipidele biomembranelor, el poate conţine şi alte structuri glicoproteice adsorbite pe partea externă a membranei celulare. (Fig. 34).

Complexitatea structurală şi funcţională a unor oligozaharide din glicocalix, cumulată cu localizarea lor exclusivă pe partea extracelulară sugerează cel puţin un rol esenţial jucat de glicocalix: cel de recunoaştere celulară. Procesul de recunoaştere celulară este esenţial în auto-structurarea mai multor celule cu funcţii identice, ce formează un ţesut celular, sau în etapele ce constitue dinamica sistemului imunitar al organismelor superioare.

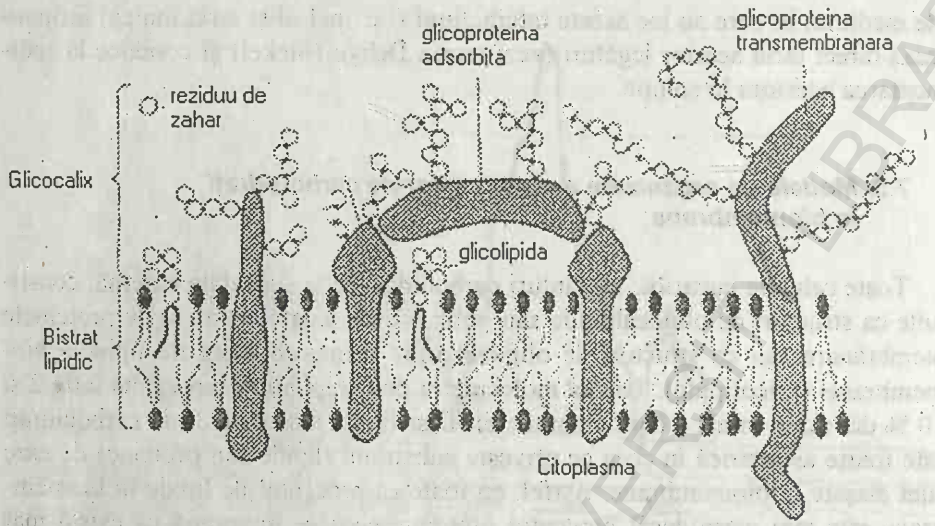


Fig. 34. Reprezentarea pictorială a glicocalix-ului membranar, format din lanţurile de carbohidraţi ataşaţi pe proteinele membranare sau lipidele biomembranelor

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

8. Proprietăți electrice elementare ale bistraturilor lipidice

Am arătat mai sus că biomembranele, constituite esențial din bistraturi lipidice, au un grad ridicat de organizare spațială a lipidelor componente. În general, grupările hidrocarbonate (CH_2) şi cele polare ale lipidelor din compoziția biomembranelor sunt orientate după axe (denumite axe directoare) transversale diferite în raport cu planul membranei. Datorită proceselor de difuzie 'rotațională' (spre deosebire de difuzia translațională, în care macromoleculele efectuează mişcări de translație spațială), aceste grupări execută rotații anizotrope în jurul axelor directoare. Mai mult, datorită flexibilității ridicate a grupurilor hidrocarbonate din regiunea hidrofobă a lipidelor, gradul lor de aliniere va fi dependent de distanța față de interfața lipid-soluție apoasă. Pentru a caracteriza gradul local de orientare a grupării din lanțul hidrofob al unei lipide (ce poate conține n grupări distincte CH_2) în raport cu o axă directoare aleasă, se definește parametrul de ordine locală (S_i):

$$S_i = \frac{1}{2}\left\langle 3\cos^2\theta_i - 1 \right\rangle \qquad (8.1)$$

unde:

- $\langle\ \rangle$ reprezintă media după toate orientările termodinamic-posibile ale grupării $(CH_2)_i$ în jurul axei directoare alese;
- θ_i este unghiul format de axa locală a grupării CH_2 cu axa directoare, într-o configurație termodinamică oarecare (i).

Pentru cazul unui lanț hidrofob al unei lipide cu N grupări CH_2, parametrul de ordine S este dat de:

$$S_i = \frac{1}{2}\left\langle N^{-1}\sum_{j=1}^{N}(3\cos^2\theta_{ji} - 1 \right\rangle \qquad (8.2)$$

Experimental, valoarea parametrului de ordine locală S_i în bistraturi lipidice poate fi pusă în evidență prin experimente de rezonanță magnetică nucleară (RMN), spectroscopie electronică de spin, fluorescență, spectroscopie Raman.

Parametrul de ordine al unei membrane bi-lipidice este determinat şi de densitatea așa-numitelor *defecte* ale lanțurilor hidrocarbonate. Cel mai simplu exemplu de defect este dat de tranziția unei grupări CH_2 din starea de conformație *trans* în *cis*, fapt ce conduce la 'îndoirea' locală a lanțului hidrocarbonat respec-

tiv. Un aspect cu importanţă semnificativă a existenţei *defectelor* lipidice este generarea de *volum liber* (neocupat) în miezul hidrofob al biomembranelor, care poate fi element fizic esenţial pentru difuzia altor molecule exogene biomembranei. De asemenea, defectele membranare au grad ridicat de mobilitate în planul membranei; la 300 K, un asemenea defect poate difuza cu rate de ~ 10^{11} s^{-1}.

În lumina celor expuse mai sus, putem înţelege câteva dintre particularităţile proceselor de transport de substanţă prin membrane biologice. Transportul apei prin biomembrane în stare lichidă este foarte eficient (coeficient de permeabilitate P ~ 10^{-3} cm/s), şi devine cu aproape trei ordine de mărime mai redus atunci când lipidele membranare sunt în stare cristalină. Determinările experimentale au demonstrat că procesul de transport al apei prin biomembrane este controlat de difuzia defectelor de structură ale lipidelor constituente. Aceste defecte joacă două roluri esenţiale în transportul apei prin biomembrane:

1. Prin generarea lor fluctuantă, ele dau naştere în miezul hidrofob al membranei la acele volume libere în care moleculele de apă se pot insera;
2. Continua dinamică a acestor defecte, formarea şi dispariţia lor stochastică, generează forţe locale, care contribuie la difuzia ordonată a moleculelor de apă prin biomembrană, în lungul axei grupării hidrocarbonate a lipidelor.

Dacă notăm prin "D" coeficientul de difuzie al defectelor, "d" grosimea biomembranei şi prin "K" coeficientul de distribuţie a moleculelor de apă între mediul apos şi cel hidrofob al membranei, coeficientul de permeabiliate a apei este dat de:

$$P = KDd^{-1} \qquad (8.3)$$

Astfel, pentru o interfaţă soluţie apoasă/decan unde K ~ 6 × 10^{-5}, la o temperatură de 300 K, permeabilitatea apei printr-un mediu cu grosimea de 5 nm este de ~ 10^{-3} cm/s (pentru decan, D ~ 10^{-5} cm^2/s).

Trebuie însă reţinut că, la fel ca şi în cazul altor molecule cu proprietăţi de permeabilitate prin biomembrane similare (ex., anestezice locale), un alt factor ce favorizează permeabilitatea relativ mare a apei prin miezul hidrofob al biomembranelor îl constitue neutralitatea sa electrică. În schimb, ionii diferitelor elemente cu rol important în procesele biologice (ex., K^+, Na^+) nu difuzează la fel de uşor prin biomembrane în lipsa proteinelor specializate de transport (vezi capitolele următoare). Pe de o parte, raza hidratată a ionilor hidrataţi este mult mai mare decât raza unei molecule de apă (vezi capitolele precedente), fapt ce constitue o primă barieră de stericitate la difuzia ionilor prin defectele de structură lipidică. Pe de altă parte, tranziţia ionilor din mediul lichid în cel lipidic hi-

drofob este un proces puternic endoenergetic (vezi capitolele precedente – *Energia Born*). Este deci necesară o energie termică suficient de mare a ionilor în soluția apoasă pentru ca ei să traverseze biomembranele. Cu toate acestea, rezistența electrică specifică a bistraturilor lipidice este foarte mare, dar finită ($\sim 10^8 - 10^9\ \Omega cm^2$). În consecință, pentru măsurarea precisă a valorii rezistenței acestor sisteme moleculare, trebuie utilizate instrumente electronice speciale, cu rezistență internă foarte mare şi sensibilitate electrică ridicată (electrometre).

Pentru a evalua teoretic valoarea capacității electrice a unui bistrat lipidic, să considerăm un asemenea bistrat, cu grosime "d" şi constantă dielectrică absolută ε_m care este în contact cu o soluție electrolitică binară 1:1 (în semi-spațiile mărginite de x = -d şi x = 0).

În prezența unei diferențe de potențial $U = \Psi_{x=\infty} - \Psi_{x=-\infty}$ (unde $\Psi_{x=\infty}$ şi $\Psi_{x=-\infty}$ reprezintă potențialele din soluție, de o parte şi de cealaltă a bistratului lipidic), acest bistrat lipidic se va comporta ca un condensator, facilitând existența unor sarcini nete diferite de zero de o parte şi de cealaltă a bistratului. În cazul cel mai general, în care lipidele constituente ale bistratului au capetele polare încărcate electric la pH-ul soluției electrolitice, concentrațiile ionilor negativi şi pozitivi în imediata vecinătate a interfeței bistrat lipidic – soluție electrolitică vor fi diferite de valorile lor în soluție.

Astfel, pentru x >= 0, concentrațiile acestor ioni sunt date de relațiile lui Boltzmann:

$$c_+(x) = c_{solutie} e^{-\varphi(x)}$$
$$c_-(x) = c_{solutie} e^{\varphi(x)}$$
$$iar: \qquad (8.4)$$
$$\varphi(x) = \frac{F[\Psi(x) - \Psi(\infty)]}{RT}$$

unde:

- $c_+(x)$, $c_-(x)$ reprezintă concentrațiile sarcinilor pozitive şi negative la distanța x de bistratul lipidic
- $c_{soluție}$ este concentrația acestor sarcini în soluție
- F este constanta lui Faraday.

Aşa cum vom vedea şi în capitolele următoare, expresiile de mai sus indică faptul că la interfața bistrat lipidic – soluție electrolitică, condiția de electroneutralitate nu mai este respectată, ca în soluția electrolitică, unde $c_+ = c_-$, fapt ce conduce la acumularea unei sarcini electrice totale diferite de zero în acest spațiu.

Forma ecuațiilor de mai sus este simplificată în ceea ce privește valoarea potențialelor electrice utilizate; astfel, în valoarea efectivă a energiei potențiale a ionilor în câmpul electric local, s-au neglijat efectele forțelor de tip 'imagine', care se exercită asupra unui ion aflat în imediata vecinătate a unei interfețe între două medii cu permitivități electrice diferite (vezi această lucrare, sau orice tratat de *Electrodinamică* - bibliografie).

Utilizând ecuația lui Poisson pentru cazul unidimensional:

$$\frac{d^2\Psi(x)}{dx^2} = -\frac{F[c_+(x) - c_-(x)]}{\varepsilon} \tag{8.5}$$

unde ε este permitivitatea electrică absolută a apei, se obține prin înlocuire:

$$\frac{d^2\varphi(x)}{dx^2} = \kappa^2 \sinh \varphi(x)$$

unde (8.6)

$$\kappa = \sqrt{\frac{2}{\varepsilon}\frac{F^2 c_{solutie}}{RT}}$$

(în acest formalism, κ se numește parametrul Debye-Hückel)

Pentru condițiile la limită:

$$\Psi(\infty) = \frac{U}{2}$$

si (8.7)

$$\left(\frac{d\Psi}{dx}\right)_{x=\infty} = 0$$

soluția ecuației Poisson este:

$$\Psi(x) = \frac{U}{2} + 2\frac{RT}{F}\ln\frac{1-\tanh(\frac{\alpha}{2})e^{-\kappa x}}{1+\tanh(\frac{\alpha}{2})e^{-\kappa x}}$$

unde (8.8)

$$\alpha = \frac{F\left[\frac{U}{2} - \Psi(0)\right]}{2RT}$$

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Dacă se presupune că în membrana lipidică condiția de electroneutralitate este respectată (specific, $c_+ = c_- = 0$ – ionii nu difuzează prin bistratul lipidic), potențialul electric variază liniar prin membrană:

$$\Psi(x) = \Psi(0)\frac{2x+d}{d} \qquad (-d \le x \le 0) \tag{8.9}$$

Impunând condițiile la limită:

$$\varepsilon_m\left(\frac{d\Psi_m}{dx}\right)_{x=0} = \varepsilon\left(\frac{d\Psi(x)}{dx}\right)_{x=0} \tag{8.10}$$

obținem:

$$\frac{\kappa d\varepsilon \sinh\alpha}{\varepsilon_m} + 2\alpha = \frac{UF}{2RT} \tag{8.11}$$

(ε_m este permitivitatea electrică absolută a domeniului hidrofob al membranei studiate).

Capacitatea electrică *specifică* a bistratului lipidic (F/cm^2) este $C = \frac{\sigma}{U}$, unde σ reprezintă valoarea densității de sarcină membranară (C/cm^2):

$$\sigma = F\int_0^\infty (c_+(x) - c_-(x))dx = \frac{4c_{solutie}F}{\kappa}\sinh\alpha \tag{8.12}$$

Cu ajutorul acestor ultime două relații matematice, rezultă expresia capacității specifice a bistratului lipidic:

$$C = C_m \frac{\sinh\alpha}{\frac{2\alpha\varepsilon_m}{\kappa d\varepsilon} + \sinh\alpha} \tag{8.13}$$

În relația de mai sus, C_m semnifică valoarea geometrică a capacității specifice a bistratului lipidic, pentru cazul în care lipidele componente ale bistratului sunt neutre electric, și deci nu există o acumulare de sarcină electrică netă la interfața bistrat lipidic – soluție electrolitică ($C_m = \frac{\varepsilon_m}{d}$).

Așadar, capacitatea electrică a bistratului lipidic este mai mică decât valoarea sa 'geometrică'; în cazul în care concentrația ionilor în soluția electrolitică este foarte mare ($1/\kappa$ devine foarte mic), chiar în condițiile fizice expuse mai sus $C \sim C_m$.

BCU "LUCIAN BLAGA" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

În figura următoare (Fig. 35) sunt prezentate datele experimentale ale unui experiment simplu, cu ajutorul căruia se pot determina în laborator valorile rezistenței și capacității electrice echivalente ale unui bistrat lipidic artificial.

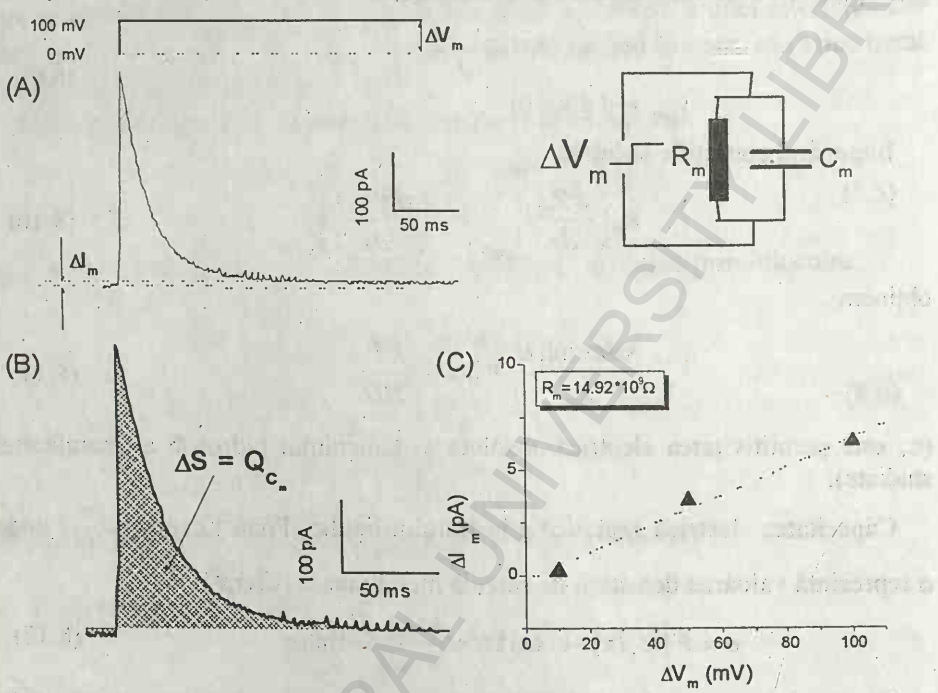


Fig. 35. Determinarea experimentală a caracteristicilor electrice principale (rezistența și capacitatea electrică) ale unui bistrat lipidic artificial (Tudor Luchian, *rezultate nepublicate*). Vezi detalii in text.

Având în vedere detaliile structurale ale unei membrane biologice (vezi mai sus) din punct de vedere electric o asemenea biomembrană se poate reprezenta cu ajutorul unor elemente pasive de circuit ca un rezistor (R_m) cuplat în paralel cu un capacitor (C_m).

În urma aplicării din exterior a unei diferențe de potențial transmembranare ΔV_m de forma 'treaptă', în acest circuit se stabilește un curent electric care variază în timp așa cum este arătat în Fig. 34, A. Din analiza numerică a acestui curent electric se pot determina experimental valorile rezistenței echivalente R_m și a capacității electrice C_m a biomembranei.

Astfel, curentul electric 'rezidual' ΔI_m reprezintă valoarea componentei de curent care se scurge prin ramura rezistivă a biomembranei, în condițiile în care

diferența de potențial aplicată este ΔV_m. (Fig. 34, panel A). Trebuie menționat că, deoarece rezistența electrică a electrozilor de măsură utilizați în astfel de experimente este mult mai mică (~ 1 kΩ) în comparație cu cea a biomembranei, în evaluările rezistenței electrice a biomembranei se poate neglija contribuția rezistenței electrozilor la magnitudinea curentului electric ce se stabilește într-un astfel de circuit. Evident, dacă biomembrana s-ar comporta ca un dielectric ideal, rezistența electrică a acesteia ar tinde spre infinit iar curentul electric 'rezidual' ΔI_m ar tinde spre zero. Efectuând repetitiv experimentul reprezentat în Fig. 34, la diferite valori ale diferenței de potențial 'treapta' ΔV_m, se pot măsura diferite valori corespunzătoare ale componentei ΔI_m. Utilizând în continuare reprezentarea grafică a dependenței $\Delta I_m = \Delta I_m (\Delta V_m)$, se poate deduce, utilizând fitarea acestor date experimentale cu o dreaptă, valoarea rezistenței echivalente R_m a biomembranei (Fig. 34, panel C).

Pentru a deduce valoarea capacității electrice a biomembranei se poate utiliza un raționament pe cât de simplu, pe atât de elegant. Se știe că, prin definiție, capacitatea electrică a unui sistem este dată de:

$$C = \frac{Q}{U} \tag{8.14}$$

unde Q reprezintă sarcina electrică ce este stocată în acel sistem în urma aplicării din exterior a diferenței de potențial U.

Prin definiție, curentul electric total din circuitul electric echivalent al biomembranei (Fig. 35) este dat de:

$$I = \frac{dQ}{dt} \tag{8.15}$$

Prin integrarea curentului electric din circuitul biomembranei între intervalul de timp inițial t = 0, când se aplică din exterior diferența de potențial 'treapta' ΔV_m, și un timp oarecare t, se poate determina sarcina totală scursă prin circuitul biomembranei în acel interval temporal Δt.

$$Q_{\Delta t} = \int_0^t I(t)dt \tag{8.16}$$

Datorită prezenței în circuitul electric echivalent al biomembranei a rezistenței R_m, cu cât Δt este mai mare cu atât $Q_{\Delta t}$ va fi mai mare.

Pentru a determina corect sarcina electrică stocată între armăturile capacitorului C_m, si care este numeric egala cu aria ΔS (Fig. 35) vor trebui respectați următorii pași:

1. integrala de mai sus să fie făcută doar până la acel moment temporal când încărcarea condensatorului este completă, adică până când variația curentului electric prin circuit devine nulă. Din acel moment, singura contribuție la variația de sarcină electrică în circuitul biomembranei este dată de prezența rezistorului R_m în câmpul electric creat de diferența de potențial ΔV_m.

2. din valoarea sarcinii electrice scursă prin circuitul biomembranei, așa cum a fost procedat la punctul precedent, trebuie scăzută algebric contribuția sarcinii electrice care se scurge prin rezistorul R_m. Justificarea simplă a acestei afirmații este dată de legea I a lui Kirckhoff:

$$I(t) = I_{C_m}(t) + I_{R_m}(t) \tag{8.17}$$

În acest fel, valoarea rezultantă a integralei calculată va fi numeric egală cu sarcina electrică Q_{C_m} stocată între 'plăcile' condensatorului C_m (Fig. 35, B).

Valoarea lui C_m se calculează în continuare după expresia:

$$C_m = \frac{Q_{C_m}}{\Delta V_m} \tag{8.18}$$

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

9. Transportul ionilor prin biomembrane

Biomembranele au un foarte înalt grad de impermeabilitate pentru transportul trans-celular al moleculelor polare sau al ionilor. După cum am subliniat şi într-un capitol anterior, există două fenomene fizice care fac acest transport foarte nefavorabil energetic:

- datorită diferenţei mari de permeabilitate electrică relativă (în interiorul membranei $\varepsilon \sim 2$, iar în mediul apos $\varepsilon \sim 80$), energia proprie a ionilor şi moleculelor polare este mult mai mare în miezul hidrofob al biomembranelor decât în mediul apos, extracelular sau intracelular. Astfel, pentru transferul unui asemenea sistem ionic sau molecular prin membrana celulară trebuie implicat un consum extern de energie;
- prezenţa interacţiunilor electrostatice între moleculele dipolare sau ioni şi moleculele polare de apă conduce la formarea unei sfere de hidratare în jurul acestora, în soluţii apoase (vezi capitolele anterioare). Difuzia acestor sisteme ionice hidratate prin miezul hidrofob al biomembranelor presupune de-hidratarea lor, proces care este nefavorabil energetic datorită lipsei interacţiunilor electrostatice compensatoare energetic între ioni (sau molecule polare) şi regiunile hidrocarbonate ale lipidelor în procesul de transfer trans-membranar.

Cu toate acestea, în cursul evoluţiei vieţii, celulele au trebuit să-şi dezvolte abilităţi pentru transferul trans-membranar al moleculelor hidrofile; aceste fenomene de transport sunt indispensabile comunicării intra-celulare, ingestiei moleculelor nutriente esenţiale, exocitozei produşilor finali ai metabolismului, stabilirea unor diferenţe de potenţial trans-membranare. După cum se va prezenta într-un capitol ulterior, replica evolutivă a celulelor la necesităţile de mai sus este materializată de prezenţa în membrana celulară a unor proteine integrale specifice, denumite generic 'proteine membranare transportoare'.

În figura de mai jos sunt prezentaţi coeficienţii de permeabilitate pentru transferul diferitelor substanţe prin membrana celulară, în lipsa proteinelor de transport specifice.

După cum reiese din Fig. 36, dacă timpul nu reprezintă o problemă importantă pentru un anumit proces celular, orice ion va migra trans-celular. În lipsa canalelor ionice însă, permeabilitatea ionilor este de 10^9 ori mai mică decât a apei.

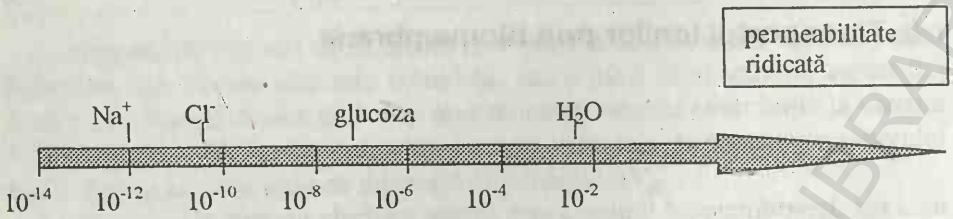


Fig. 36. Valorile coeficienţilor de permeabilitate (cm/s) a transferului diferitelor substanţe prin biomembrane, reprezentate într-o scală logaritmică

Proteinele specializate în transportul trans-membranar al ionilor sunt prezente în toate membranele celulelor vii şi au evoluat în diferite aranjamente structurale şi funcţionale. Fiecare din această proteină este specializată în transportul unei clase particulare de solvit (e.g., ioni, molecule de zahăr, aminoacizi). Specificitatea proteinelor de transport a fost demonstrată indubitabil prin experimente de inginerie genetică, în care mutaţia unor gene celulare particulare a condus la incapacitatea proteinelor transportoare studiate de a-şi exercita funcţia de transport a unor clase specifice de solviţi.

După cum vom detalia în capitolele următoare, trebuie menţionat că studiile efectuate pînă în prezent indică faptul că lanţul polipeptidic al proteinelor transportoare traversează membrana celulară de mai multe ori şi generează un canal prin bistratul lipidic cu proprietăţi de conducţie pentru o anumită categorie de solvit. În procesul de difuzie prin acest canal, solvitul nu interacţionează cu capetele hidrocarbonate ale lipidelor, ci doar cu anumite grupări hidrofile ale proteinei transportoare.

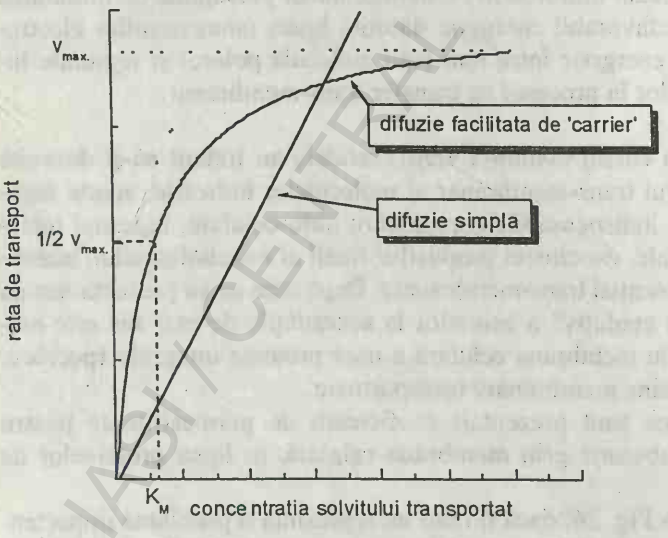


Fig. 37

Diferenţa cinetică între ratele de transport ale diferiţilor solviţi prin biomembrane în cazul proceselor de difuzie simplă şi difuzie facilitată de proteine membranare specifice (*'carriers'*)

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Există două clase majore de proteine transportoare membranare: **proteine 'carrier'** şi **canale ionice**, iar criteriul de diferenţiere între aceste clase este determinat de modul de exercitare a funcţiei transportoare:

- proteinele 'carrier' interacţionează specific cu solvitul de transportat (să presupunem, pe partea internă a unei celule) şi apoi, datorită unei schimbări de conformaţie, transferă acel solvit de cealaltă parte a membranei;
- canalele ionice reprezintă (în termeni foarte simpli) 'găuri' trans-membranare, umplute în general cu molecule de apă, prin care moleculele sau ionii de transportat difuzează, în virtutea gradientului lor electrochimic.

O clasă a proteinelor de transport permite tranziţia prin difuzie pasivă transmembranară a moleculelor de solvit; dacă molecula transportată nu este încărcată electric, prezenţa unui gradient de concentraţie transmembranar determină un flux net diferit de zero prin membrana lipidică. Dacă molecula transportată are o sarcină netă (sau dacă este vorba de ioni), gradienţii de concentraţie şi cel de câmp electric transmembranar determină mărimea vectorului flux de solvit transportat.

Există însă şi o altă clasă a proteinelor de transport, care facilitează difuzia solviţilor **împotriva** gradientului lor electrochimic; acest tip de transport este denumit **transport activ**, este cuplat cu o sursă de energie metabolică (e.g., hidroliza moleculelor de ATP) şi este întotdeauna mediat de proteine tip `carrier`.

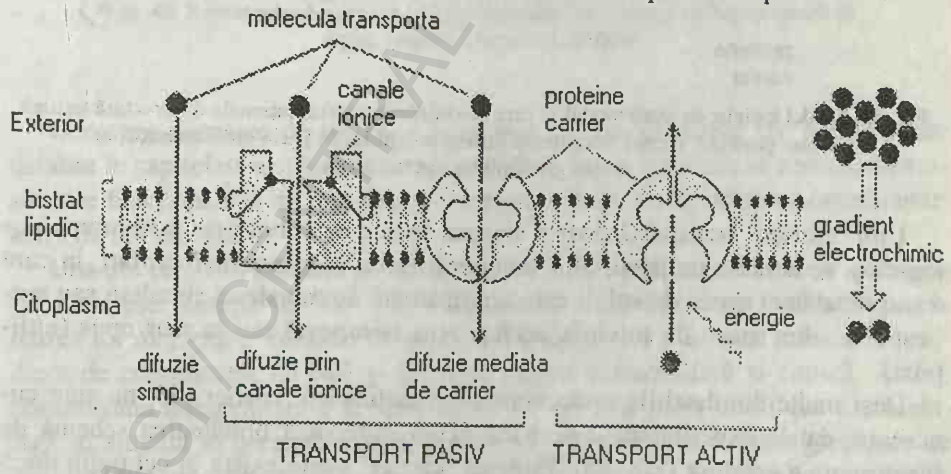


Fig. 38. Reprezentarea schematizată a mecanismelor moleculare implicate în transportul transmembranar pasiv şi activ: difuzie mediată de canale ionice şi de carrieri

Procesul de difuzie trans-membranară a moleculelor de solvit prin intermediul proteinelor tip 'carrier' este foarte asemănător cu modul de lucru al unei enzime (vezi capitolele precedente). Astfel, fiecare tip de 'carrier', corespondentul unei enzime, are situsuri de interacțiune specifică pentru moleculele de solvit (substrat). Când 'carrier'-ul este saturat, toate situsurile de legătură sunt ocupate, rata de transport trans-membranar devine maximă. Fiecare 'carrier' este caracterizat de o rată de transport maximă şi constanta de legătură (echivalentul constantei lui Michaelis K_M) pentru un anume solvit. Ca şi în cazul enzimelor, interacțiunea specifică solvit -'carrier' poate fi blocată de inhibitori competitivi sau necompetitivi. Figura 38 sintetizează trăsăturile esențiale de structură ale unui 'carrier'.

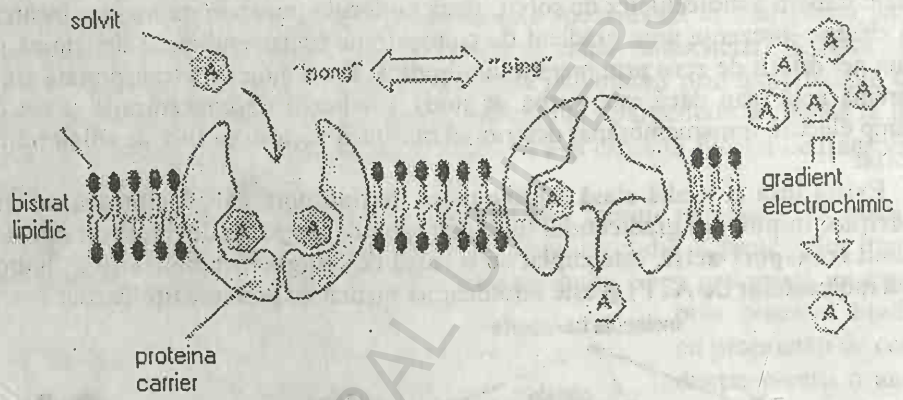


Fig. 39. Model ipotetic ce arată modul în care modificările conformaționale de structură terțiară ale unei proteine 'carrier' facilitează difuzia solvitului (A) prin biomembrane, în sensul gradientului electrochimic

Unii 'carrieri' transportă doar o singură specie de solvit prin membrana biologică şi se numesc uniporți; alții funcționează ca **transportori cuplați**, în care transportul unei specii de solvit este acompaniată de transferul simultan sau secvențial al altei specii de solvit în acelaşi sens (**simport**) sau în sens opus (**antiport**).

Deşi multe din detaliile moleculare ale funcționării 'carrier'-ilor nu sunt cunoscute, datele experimentale de până acum sugerează următoarea schemă de funcționare a acestora (Fig. 38). Proteina 'carrier' poate exista în cel puțin două stări conformaționale, denumite generic 'ping' şi 'pong', care să sugereze mecanismul 'ping-pong' de transfer al solviților. Cum este arătat în figura 38, în starea 'pong', situsurile de legătură ale proteinei transportoare sunt expuse spre

partea extracelulară, iar în starea 'ping' spre partea citosolică. Tranziția între cele două stări se presupune a fi stocastică și reversibilă. Dacă concentrația solvitului este mai mare în partea extracelulară a membranei, vor exista mai multe molecule de solvit care se leagă de 'carrier' în starea 'pong', și deci în procesul de tranziție stocastică 'ping-pong' a 'carrier'-ului se va iniția un flux net de solvit, în sensul gradientului sau de concentrație.

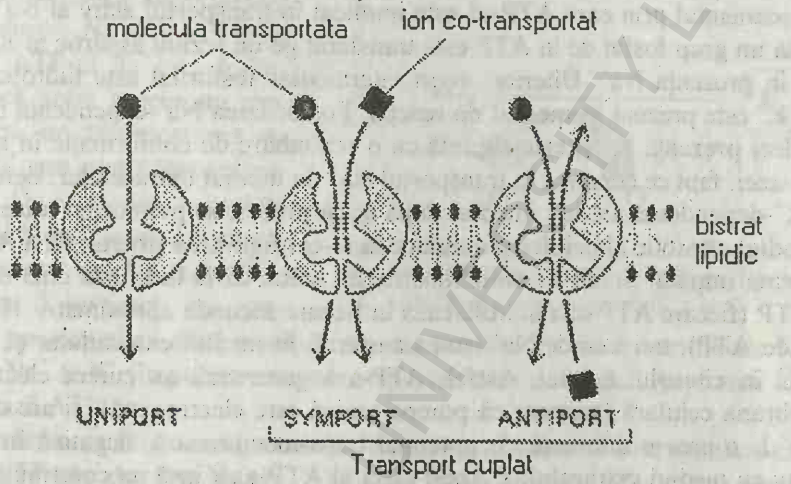


Fig. 40. Reprezentarea simplificată a proteinelor tip 'carrier' ce funcționează în regim uniport, simport și antiport

Deoarece elemente de structură și funcție ale canale ionice vor fi prezentate detaliat în capitolele următoare, în acest capitol vor fi discutate în continuare trăsăturile funcționale și de organizare membranară ale transportorilor membranari activ de tip 'carrier'.

Una din cele mai studiate proteine 'carrier' implicată în proces activ de transfer ionic este **pompa de Na^+ - K^+**. Determinări cantitative au evidențiat că, în marea lor majoritate, celulele au mecanisme intrinseci prin care mențin un gradient de concentrație de Na^+ și K^+ între partea extracelulară și citosol. Astfel, concentrația intracelulară a K^+ este de 10-20 ori mai mare decât cea extracelulară, și situația se prezintă invers pentru Na^+. Menținerea acestor gradiente de concentrație este vitală pentru funcționalitatea electrică a celulelor excitabile, precum și pentru reglarea volumului celular. În 1957, Jens Skou a descoperit o enzimă care hidrolizează ATP-ul doar dacă Na^+, K^+ și Mg^{2+} sunt prezenți în mediul de reacție.

$$ATP + H_2O \xrightarrow{Na^+, K^+, Mg^{2+}} ADP + P_i + H^+ \qquad (9.1)$$

Skou a sugerat că această enzimă, denumită Na^+-K^+ - ATPaza, este o parte integrală a proteinei ce menține gradientul ionic celular şi că hidroliza ATP-ului reprezintă sursa de energie necesară transportului activ al ionilor de Na^+ şi K^+ prin membrana biologică. O observație foarte importantă utilizată pentru a explica mecanismul prin care ATP-ul este implicat în transportul activ al Na^+ şi K^+ a fost că un grup fosfat de la ATP este transferat pe un reziuu aspartic al ATP-azei doar în prezența Na^+. Ulterior, acest intermediar fosforilat este hidrolizat doar dacă K^+ este prezent în mediul de reacție. Fosforilarea Na^+-dependentă nu necesită deci prezența K^+ şi este cuplată cu o schimbare de conformație în structura ATP-azei, fapt ce conduce la transportul Na^+ în mediul extracelular; defosforilarea K^+-dependentă are loc imediat după acest proces, se petrece cu transferul K^+ în mediul citosolic al celulei şi conduce la re-configurarea structurală a ATP-azei în forma inițială. Studii de stoichimetrie au arătat că la hidroliza unei molecule de ATP (fiecare ATP-aza hidrolizează în fiecare secundă aproximativ 100 molecule de ATP), trei ioni de Na^+ sunt transferați în mediul extracelular şi doi ioni de K^+ în citosolul celulei. Astfel, ATP-aza generează un curent electric prin membrana celulară (spunem că pompa ionică este electrogenă), şi are deci tendința de a crea o diferență de potențial trans-membranară, negativă în interior relativ cu mediul extracelular. Acest efect al ATP-azei însă nu contribuie cu mai mult de 10 % la stabilirea valorii finale a potențialului de repaus membranar (vezi capitolele următoare).

Schema generală a ciclului enzimatic al Na^+-K^+-ATP-azei este redată în Fig. 41.

Interacțiunea dintre Na^+ intracelular şi enzima conduce la fosforilarea stării inițiale (E_1) a enzimei de către ATP; acest proces de fosforilare are loc doar în prezența Na^+ şi Mg^{2+} şi produce modificări conformaționale în structura enzimei, ce cauzează expunerea situsului de legătură pentru Na^+ al enzimei, cu trei ioni de Na^+ legați, spre partea extracelulară. În această stare (E_2-P), datorită interacțiunilor alosterice determinate de schimbarea conformațională, afinitatea enzimei pentru sodiu devine foarte redusă, astfel încât sodiul va fi eliberat în mediul extracelular. Pe de altă parte, în starea conformațională E_2-P, enzima are afinitate mare pentru K^+; legarea a doi ioni de K^+ de pe partea externă a celulei conduce la defosforilarea enzimei care, 'pierzând' gruparea fosfat (P_i), îşi modifică structura conformațională astfel încât situsul de legatură, cu ionii de K^+ legați, va fi expus spre citosolul celulei (starea conformațională E_2). Enzima nu este stabilă în starea E_2, şi starea de echilibru în care ajunge la sfârşitul acestui ciclu (E_1) are afinitate minimă pentru K^+, care este astfel eliberat în mediul intracelular.

Dintre cei mai comuni inhibitori Na^+-K^+-ATP-azei menționăm ionul de vanadiu și substanța organică denumită ouabaină.

O caracteristică importantă a funcționării Na^+-K^+-ATP-azei este că ATP-ul nu este hidrolizat dacă acest proces nu este cuplat cu un transport net de Na^+ și K^+, așa cum a fost indicat mai sus. De asemenea, sensul de reacție al hidrolizei enzimatice a ATP-ului de către Na^+-K^+-ATP-aza poate fi **inversat**; s-a constatat experimental că dacă o celulă este expusă la concentrații artificiale foarte mari de Na^+ și K^+ (în partea externă, respectiv internă a celulei), pompa ionică sintetizează ATP.

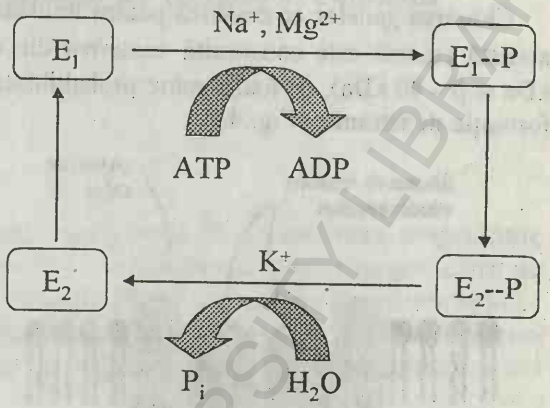


Fig. 41. Ciclul enzimatic al Na^+ - K^+ ATP-azei care transportă ionii de Na^+ și K^+ împotriva gradientului de concentrație (vezi detalii în text)

Reprezentarea formală a proceselor de transport ionic ce sunt corelate cu hidroliza ATP-ului de către Na^+-K^+-ATP-aza este prezentată în figura ce urmează:

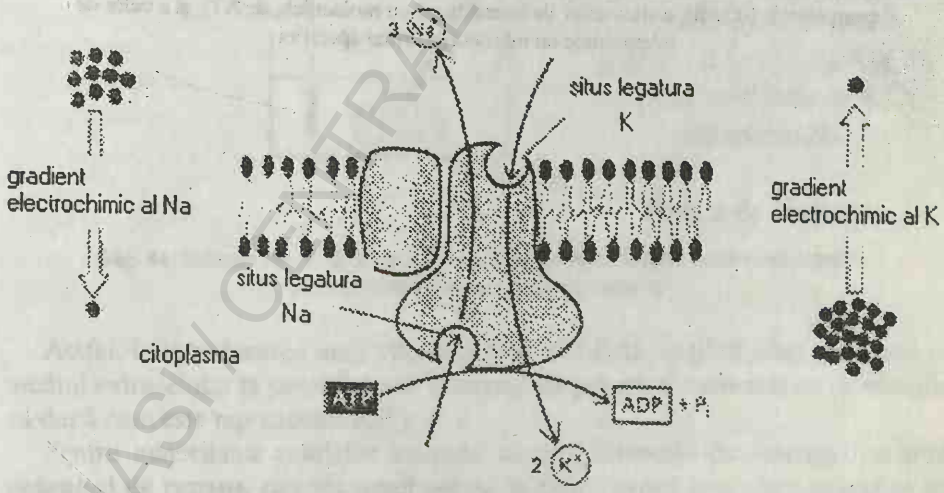


Fig. 42. Mecanismul molecular simplificat de funcționare al Na^+-K^+-ATP-azei, cu prezentarea situsului de interacțiune dintre aceasta și ionii de potasiu (vezi text)

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Clonarea genelor ce codează pentru translarea Na^+-K^+-ATP-azei au arătat că această enzimă este constituită cuaternar din două subunităţi (numite α - 112 kDa şi β - 40 kDa), cu foarte mare probabilitate de asociere membranară în conformaţie de tetramer (Fig. 43).

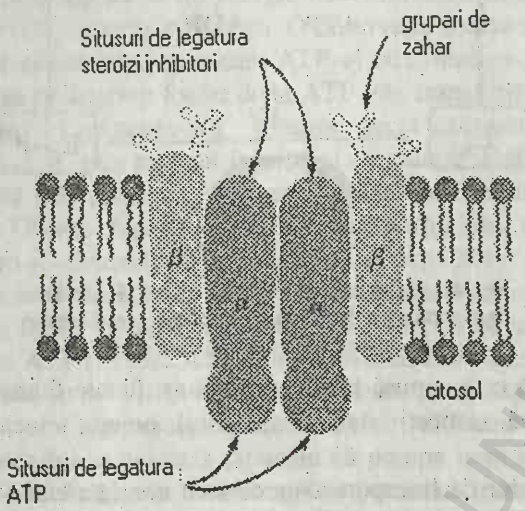


Fig. 43

Diagrama simplificată a structurii Na^+-K^+-ATP-azei, cu evidenţiarea subunităţilor proteice componente (α şi β), a situsurilor de interacţiune cu moleculele de ATP şi a celor de interacţiune cu inhibitori steroizi specifici

Determinările de hidropatie au sugerat că subunităţile α conţin cel puţin 7 α-helix-uri transmembranare, iar situsul de legătură pentru ATP este localizat pe partea intracelulară a acestora. Subunităţile β sunt presupuse a fi constituite din patru α-helix-uri transmembranare şi sunt asociate cu 3 lanţuri de oligozaharide de tipul N-linked (vezi capitolele anterioare).

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

10. Potențialul transmembranar de repaus al celulelor biologice

Există o tendință generală printre biofizicieni de a reprezenta proprietățile membranelor celulare şi a transportorilor ionici intrinseci prin diagrame electrice simple, care surprind tocmai proprietățile electrice echivalente ale membranelor.

Una din cele mai importante caracteristici electrice ale unei celule vii o reprezintă existența unei diferențe de potențial între mediul său intern (citosol) şi cel extracelular.

Această diferență de potențial poate fi măsurată foarte simplu, cu ajutorul unui milivoltmetru şi a doi electrozi a căror dispunere este realizată ca în reprezentarea de mai jos (Fig. 44):

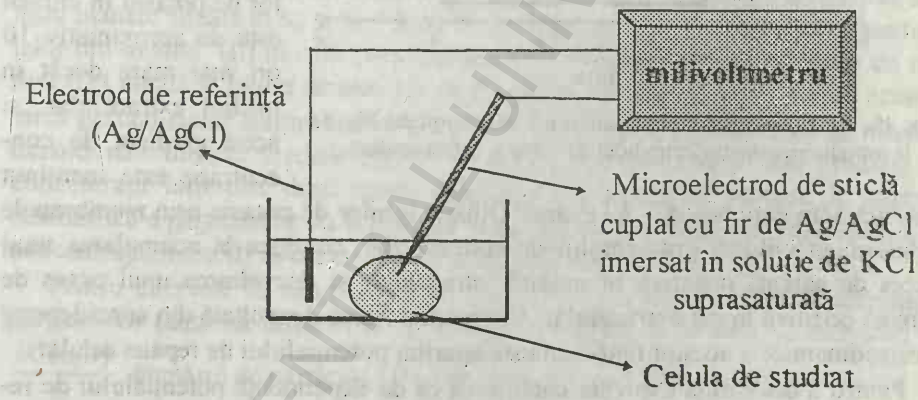


Fig. 44. Schema electrică de principiu a dispozitivului utilizat pentru măsurarea diferenței de potențial de repaus celular

Astfel, la introducerea unui microelectrod în celulă, celălalt fiind menținut în mediul extracelular la potențial nul, diferența de potențial măsurată se va modifica după cum este reprezentat mai jos:

Pentru majoritatea celulelor animale, această diferență de potențial, numită **potențial de repaus**, rămâne neschimbată în timp; există însă clase specifice de celule (e.g., neuronii, celulele musculare) denumite celule active electric (excitabile), în care diferența de potențial transmembranar se modifică în timp condu-

BCU - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

când la transmiterea unui influx nervos în lungul membranei respective (vezi şi în capitolele următoare).

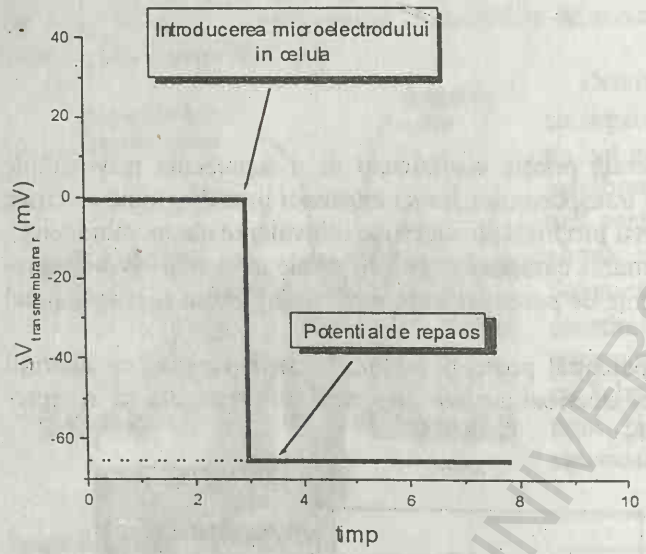


Fig. 45. Modificarea valorii indicate de milivoltmetrul din Fig. 44 la introducerea microelectrodului de sticlă în celula studiată.

Fără a intra acum în detalii funcţionale, acest aspect va fi elaborat într-un capitol ulterior, putem afirma că diferenţa de potenţial de repaus celulară apare în principal (dar nu exclusiv !) drept rezultat al gradientului de concentraţie transmembranar al ionilor de potasiu; concentraţia ionilor de potasiu în citosol este de aproximativ 10 ori mai mare decât în mediul extracelular, şi acest gradient de concentraţie este menţinut datorită activităţii Na^+-K^+-ATP-azei. Difuzia ionilor de potasiu prin membranele celulare, în virtutea gradientului de concentraţie, conduce la acumularea unui exces de sarcină negativă în mediul intracelular şi dezvoltarea unui exces de sarcină pozitivă în cel extracelular. Consecinţa fizică dezvoltată din considerente electrodinamice a acestui fenomen este apariţia potenţialului de repaus celular.

Pentru a determina expresia cantitativă ce dă dependenţă potenţialului de repaus celular de valorile concentraţiei ionilor de potasiu în mediile intra- şi extracelulare, va trebui iniţial să dezvoltăm teoria difuziei ionice într-un câmp electric extern şi sub acţiunea unui gradient de concentraţie.

10.1. *Ecuaţia lui Smoluchowski*

Pentru a deriva ecuaţia de mişcare browniană a unei colecţii de particule, vom considera cazul particular în care difuzia are loc într-un tub de lungime infinită şi de arie transversală egală cu $1\ m^2$.

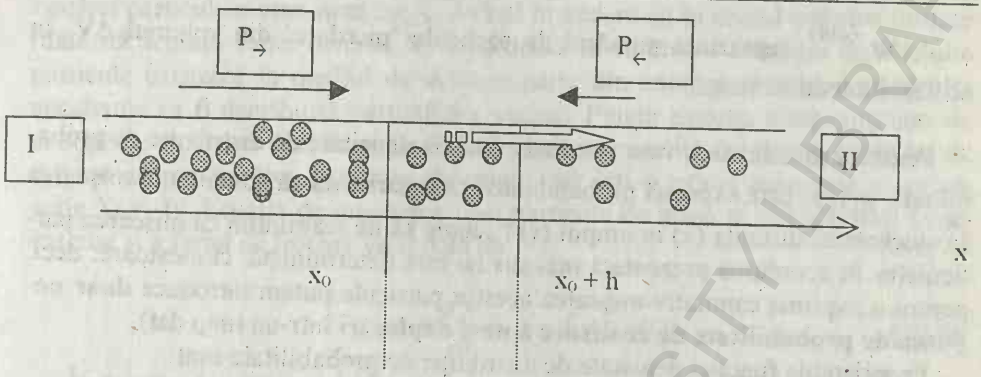


Fig. 46. Modelul simplificat de difuzie al unor particule, utilizat pentru deducerea ecuației generale care dă expresia fluxului de particule difuzante în funcție de valoarea forțelor generalizate.

Mișcarea particulelor (considerate un ansamblu Markov) este stochastică, iar existența gradientului de concentrație ce separă mediul cu volum ΔV_0 ce se află între planele situate în x_0 și $x_0 + h$ nu exclude probabilitatea ca mișcarea particulelor din mediul (II) în care concentrația lor este mai redusă comparativ cu mediul (I) (notată în figura de mai sus cu $P_{\leftarrow}$) să fie diferită de zero. Astfel, acumularea particulelelor conținute în volumul ΔV_0 se va datora proceselor de mișcare dezordonate dinspre mediile I și II: datorită existenței însă a unui gradient de concentrație între cele două medii, rezultatul net al acestor procese de mișcare stochastică a particulelor va fi apariția unui flux net diferit de zero din mediul cu concentrație mare (I) în cel cu concentrație mai mică (II).

Pentru intervale de timp foarte mici (t, t + τ), în care variația concentrației particulelor (datorită difuziei între cele două medii) în punctul x_0 este dată de $\frac{\partial C(x_0,t)}{\partial t}$, numărul de particule difuzante din volumul ΔV_0 este dat de:

$$\Delta n_\tau = h\tau \frac{\partial C(x_0,t)}{\partial t} \qquad (10.1)$$

Datorită mișcării independente a particulelor difuzante în volumul ΔV_0 din mediile I și II, putem scrie:

$$\Delta n_\tau = \Delta n_\tau^{(in)} - \Delta n_\tau^{(out)} \qquad (10.2)$$

în care:

– $\Delta n_\tau^{(in)}$ reprezintă numărul de particule 'primite' în volumul ΔV_0, în timpul τ, din mediul mărginit de regiunea $x < x_0$ și $x > x_0 + h$

– $\Delta n_\tau^{(out)}$ reprezintă numărul de particule 'pierdute' din volumul ΔV_0 în acelaşi interval de timp.

Pentru a calcula Δn_τ, vom introduce funcţia densitate de distribuţie de probabilitate $\varphi_\tau(x)$, care exprimă probabilitatea ca o particulă să parcurgă în mişcarea sa stochastică distanţa (x) în timpul (τ) (trebuie să ne reamintim că mişcarea particulelor în abordarea prezentată mai sus nu este deterministă, ci aleatoare; deci, pentru a exprima cantitativ mişcarea acestor particule putem introduce doar noţiunea de **probabilitate de realizare a unei deplasări** într-un timp dat).

Proprietăţile funcţiei densitate de distribuţie de probabilitate sunt:

– $\varphi_\tau(x)$ este o funcţie pară ($\varphi_\tau(x) = \varphi_\tau(-x)$ (10.3)

– când $x \to \infty$, $\varphi_\tau(x) \to 0$ (10.4)

– deoarece o particulă trebuie să fie localizată cu certitudine pe întreg spaţiul la orice moment temporal, $\int_{-\infty}^{+\infty} \varphi_\tau(x) = 1$ (10.5)

Utilizând definiţia funcţiei $\varphi_\tau(x)$, rezultă că dacă la momentul t o particulă se află în punctul x în afara volumului ΔV_0, probabilitatea ca ea să fie în volumul ΔV_0 (mărginit de x_0 şi $x_0 + h$) la momentul $t + \tau$ este $\varphi_\tau(x_0 - x)h$.

Dacă numărul de particule care la momentul t se află între planurile x şi x + dx este C(x, t)dx, numărul de particule din acestea care la momentul $t + \tau$ au difuzat în volumul ΔV_0 este dat de $hC(x, t)\varphi_\tau(x_0 - x)dx$.

Astfel, numărul de particule care au difuzat din întreg spaţiul, la momentul $t + \tau$, în volumul ΔV_0 este:

$$\Delta n_\tau^{(in)} = h\int_{-\infty}^{+\infty} C(x,t)\varphi_\tau(x_0 - x)dx \qquad (10.6)$$

În aceste condiţii, ştiind că în punctul de coordonată x_0, la momentul t, concentraţia particulelor difuzante este $C(x_0, t)$, variaţia concentraţiei particulelor în volumul ΔV_0 la momentul $t + \tau$ este dată de:

$$\left(\frac{\partial C}{\partial t}\right)\tau = \int_{-\infty}^{+\infty} C(x,t)\varphi_\tau(x_0 - x)dx - C(x_0,t) \qquad (10.7)$$

Dacă presupunem în continuare că difuzia particulelor are loc într-un câmp extern şi constant de forţe, forţa care se va exercita din partea câmpului asupra

fiecărei particule o vom nota cu X. Având în vedere că în cursul mișcării dirijate (datorită acțiunii forței externe X) o particulă se va ciocni continuu de celelalte particule existente în mediul de difuzie, parte din energia cinetică a particulei accelerate va fi distribuită particulelor vecine. Putem asimila aceste pierderi de energie cu existența unei forțe de frecare X_f ce se exercită din partea mediului de difuzie asupra fiecărei particule difuzante, iar într-o primă aproximație putem scrie $X_f = -fv$. Ecuația de mișcare a unei particule de masă m sub acțiunea forței externe și a forței de frecare va fi dată de:

$$m\frac{d\vec{v}}{dt} = \vec{X} - f\vec{v} + \vec{L}(t) \qquad (10.8)$$

În ecuația de mai sus, L(t) este un termen cu semnificație de forță externă și care este asimilat cu acel factor fizic, intrinsec sistemului de particule considerat în ansamblu, ce dă caracterul de mișcare dezordonată și impredictibilitate al unei particule individuale (vezi și capitolul *Modele de permeație ionică a canalelor ionice*). Așadar, ecuația scrisă mai sus este o ecuație stochastică, diferențială, ce conține coeficienți care depind de timp după o lege stochastică (L(t)). Rezolvând această ecuație explicit, și prin evaluarea *valorii medii temporale* a lui v(t), rezultă că *viteza medie* a unei particule în cazul de staționaritate ($t \to \infty$) are expresia:

$$v_s = \frac{1}{f}X = BX \qquad (10.9)$$

(B se numește coeficient de mobilitate mecanică a particulei).

În formula de mai sus și în ceea ce urmează, pentru a simplifica notațiile, prin v_s și X se înțeleg valorile în modul ale componentelor vectorilor corespunzători. Deducerea ecuației (10.9) s-a făcut în ipoteza simplificată a formalismului utilizat în acest capitol, în care mișcarea particulei de masă m are loc unidimensional, iar forța externă este la rândul ei, unidimensională.

Dacă viteza de drift a unei particule este mult mai mică în comparație cu vitezele de agitație termică, și dacă notăm cu φ_τ^* funcția densitate de distribuție de probabilitate în cazul particulelor ce difuzează în câmpul extern de forțe, o particulă care la momentul t este în punctul x se va afla la momentul $t + \tau$ în volumul mărginit de x_0 și $x_0 + h$ cu probabilitatea:

$$dP = \varphi_\tau^*(x_0 - x)h = \varphi_\tau(x_0 - (x + v_s\tau))h \qquad (10.10)$$

În aceste condiții, variația concentrației particulelor în volumul ΔV_0 la momentul $t + \tau$ este dată de:

$$\left(\frac{\partial C}{\partial t}\right)\tau = \int_{-\infty}^{+\infty} C(x,t)\varphi_\tau(x_0 - (x + v_s\tau))dx - C(x_0,t) \qquad (10.11)$$

Introducând notaţia $\xi = x + v_s\tau - x_0$, expresia de mai sus devine:

$$\left(\frac{\partial C}{\partial t}\right)\tau = \int_{-\infty}^{+\infty} C(x_0 + \xi - v_s\tau, t)\varphi_\tau(\xi)d\xi - C(x_0,t) \qquad (10.12)$$

Pentru cazul în care valorile $(\xi - v_s\tau)$ sunt mici, utilizând dezvoltarea în serii Taylor de puteri $(\xi - v_s\tau)$ a integrandului expesiei de mai sus în jurul valorii x_0, obţinem pentru expresia de mai sus forma echivalentă:

$$\left(\frac{\partial C}{\partial t}\right)\tau = \sum_{n=1}^{\infty}\frac{1}{n!}\left(\frac{\partial^n C}{\partial x^n}\right)_{X_0}\int_{-\infty}^{+\infty}(\xi - v_s\tau)^n\varphi_\tau(\xi)d\xi \qquad (10.13)$$

În expresia de mai sus, se poate arăta că atunci când τ este foarte mic, termenii superiori ai dezvoltării Taylor (n>2) pot fi neglijaţi; astfel, ecuaţia de mai sus devine:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = \frac{1}{2\tau}\int_{-\infty}^{+\infty}\xi^2\varphi_\tau(\xi)d\xi\left(\frac{\partial^2 C}{\partial x^2}\right) - v_s\frac{\partial C}{\partial x} + \frac{(v_s\tau)^2}{2\tau}\frac{\partial^2 C}{\partial x^2} \qquad (10.14)$$

Având în vedere că $\int_{-\infty}^{+\infty}\xi^2\varphi_\tau(\xi)d\xi = \langle\xi^2\rangle$, adică valoarea medie a pătratului deplasărilor în timpul τ, expresia de mai sus poate fi iarăşi simplificată dacă considerăm că deplasarea datorată vitezei de drif în timpul τ $(v_s\tau)$ este mult mai mică decât valoarea medie a deplasărilor datorate mişcării browniene ($\langle\xi^2\rangle >>> (v_s\tau)^2$):

$$\frac{\partial C}{\partial t} = \frac{\langle\xi^2\rangle}{2\tau}\frac{\partial^2 C}{\partial x^2} - v_s\frac{\partial C}{\partial x} \qquad (10.15)$$

Utilizând notaţiile $v_s = BX$ şi $D = \frac{\langle\xi^2\rangle}{2\tau}$ (coeficientul de difuzie al particulelor difuzante), obţinem în final celebra ecuaţie a lui Smoluchowski, derivată şi folosită de acesta în 1913 pentru studierea mişcării browniene a particulelor în prezenţa unui câmp extern de forţe:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D\frac{\partial^2 C}{\partial x^2} - BX\frac{\partial C}{\partial x} \qquad (10.16)$$

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Utilizând formula ce dă legea de conservare a masei pentru particulele difuzante:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = -\frac{\partial J_x}{\partial x} \tag{10.17}$$

unde J_x este componenta pe axa x a fluxului de particule difuzante.

ecuația lui Smoluchowski devine:

$$J_x = -D\frac{\partial C}{\partial x} + BXC \tag{10.18}$$

($C = C(x)$, pentru $x_0 < x < x_0 + h$)

Așa cum a fost presupus și în raționamentul de mai sus, în cele ce urmează se consideră cazul simplificat în care difuzia ionica are loc uni-dimensional, și deci vom utiliza în loc de J_x doar notația J.

Această ultimă ecuație (10.18) este fundamentală pentru analiza fenomenelor de transport ionice prin membranele celulare și permite exprimarea cantitativă a expresiei ce dă dependența potențialului de repaus membranar în funcție de concentrațiile ionului difuzabil în partea externă și internă a celulei.

10.2. *Ecuația lui Kramer*

În cazul în care forța externă $\vec{X}$ (introdusă în paragraful precedent) provine dintr-un câmp de forțe conservative ce are componentă nenulă doar pe axa x ($U(x)$), este adevărată expresia:

$$\vec{X} = -\frac{dU(x)}{dx}\vec{x} \tag{10.19}$$

Utilizând această expresie, ecuația lui Smoluchowski devine:

$$-\frac{J}{D} = \frac{dC}{dx} + \left(\frac{B}{D}\right)C\frac{dU(x)}{dx} \tag{10.20}$$

Deoarece:

$$\frac{d}{dx}\left\{Ce^{\frac{U(x)B}{D}}\right\} = \frac{dC}{dx}e^{\frac{U(x)B}{D}} + \left(\frac{B}{D}\right)Ce^{\frac{U(x)B}{D}}\frac{dU(x)}{dx} \tag{10.21}$$

ecuația lui Smoluchowski mai poate fi scrisă astfel:

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

$$Je^{\frac{U(x)B}{D}} = -D\frac{d}{dx}\left\{Ce^{\frac{U(x)B}{D}}\right\} \tag{10.22}$$

Ecuația de mai sus poate fi integrată între oricare două puncte din spațiu, notate prin x_0 și x_1, iar rezultatul îl reprezintă o ecuație importantă pentru descrierea fenomenelor de transport prin membrane biologice (Kramer, 1940):

$$J = -D\frac{C(x_1)e^{\frac{U(x_1)B}{D}} - C(x_0)e^{\frac{U(x_0)B}{D}}}{\int_{x_0}^{x_1} e^{\frac{U(x)B}{D}}dx} \tag{10.23}$$

Ecuația lui Kramer descrie deci macroscopic difuzia browniană a unei colecții de particule într-un câmp de forțe conservativ descris de funcția scalară U(x).

10.3. *Ecuația lui Nernst*

Una dintre cele mai utilizate aplicații ale ecuației lui Smoluchowski se referă la exprimarea cantitativă a fluxului unor particule încărcate, a căror difuzie are loc sub acțiunea simultană a unui gradient de concentrație și a unui gradient de potențial electric.

Pentru a facilita înțelegerea acestei ecuații, vom considera exemplul unei membrane semipermeabile ce separă două compartimente cu concentrații diferite ale purtătorilor de sarcină.

În exemplul de mai sus, se consideră că la momentul inițial în compartimentul (I) se găsesc ioni pozitivi (•) și negativi (○) cu concentrații egale (ce provin, de exemplu, de la dizolvarea sării KCl în apa distilată – în acest caz, ionii pozitivi sunt cei de potasiu), iar în compartimentul (II) concentrația acestora este nulă. Dacă cele două compartimente sunt ulterior puse în contact prin intermediul unei membrane cu proprietate de semipermeabilitate ionică (membrana care este permeabilă doar pentru o anumită specie de ioni – în exemplul ales, membrana permite difuzia doar a ionilor pozitivi), ionii pozitivi vor difuza din compartimentul (I) în compartimentul (II) în virtutea gradientului de concentrație. Acest fenomen, coroborat cu faptul că ionii negativi sunt excluși de la difuzia prin membrana semipermeabilă și rămân restrânși în compartimentul (I), conduce la acumularea unor sarcini nete pozitive în compartimentul (II), respectiv negative în compartimentul (I). Rezultatul net al acestor acumulări de sarcină netă necompensate în cele două compartimente este stabilirea unei diferențe de potențial

electric între compartimentele (I) şi (II). Intensitatea câmpului electric ce se stabileşte în membrana semipermeabilă are expresia:

$$\vec{E} = -\frac{d\Psi(x)}{dx}\hat{x} \qquad (10.24)$$

unde $\Psi(x)$ este funcția ce exprimă cantitativ potențialul electric prin membrana semipermeabilă.

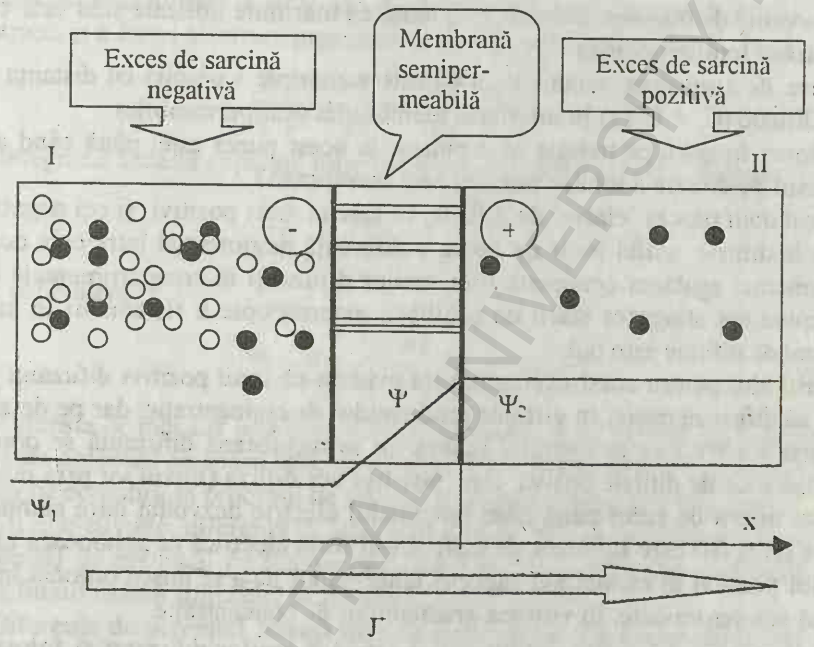


Fig. 47. Reprezentarea schematizată a mecanismului de generare a potențialului tip Nernst prin membrane semipermeabile.

La fel ca şi în situația de mai sus, se consideră că potențialul electric Ψ are componentă nenulă doar pe axa x ($\Psi(x)$).

În aceste condiții, rolul forței externe ce va acționa asupra unui ion (pozitiv, în cazul exemplului considerat) în cursul difuziei prin membrana semipermeabilă este jucat de forța electrică ce se exercită asupra lui, la interacțiunea cu câmpul electric definit mai sus:

$$\vec{X} = z^+ q_e \vec{E} = -z^+ q_e \frac{d\Psi(x)}{dx}\hat{x} \qquad (10.25)$$

BCU / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

(z^+ şi q_e reprezintă valenţa ionilor pozitivi difuzanţi, respectiv sarcina electrică elementară).

Utilizând această expresie, relaţia ce descrie cantitativ fluxul ionilor pozitivi prin membrana semipermeabilă este:

$$J^+ = -D^+ \frac{dC^+}{dx} - z^+ q_e B^+ C^+ \frac{d\Psi}{dx} \qquad (10.26)$$

În expresiile de mai sus, indicele ($^+$) arată că mărimile utilizate sunt cele corespunzătoare ionilor pozitivi.

Trebuie, de asemenea, remarcat că C^+ este o mărime variabilă cu distanţa în zona de difuzie ($C^+ = C^+(x)$ în interiorul membranei semipermeabile).

Întrebarea firească ce trebuie să o punem la acest punct este: până când are loc procesul de difuzie a ionilor pozitivi prin membrană?

În cazul unui proces 'clasic' de difuzie, în care şi ionii pozitivi, şi cei negativi participă la difuzie, astfel încât nu apare o diferenţă de potenţial între cele două compartimente, egalarea concentraţiilor ionilor difuzanţi în compartimentele (I) şi (II) reprezintă atingerea stării de echilibru macroscopic a sistemului în care fluxul total de difuzie este nul.

În cazul ales pentru acest exemplu, este evident că ionii pozitivi difuzanţi au tendinţa să difuzeze pasiv, în virtutea gradientului de concentraţie, dar pe de altă parte, forţa electrică ce se exercită asupra lor în membrana difuzantă se opune acestui fenomen de difuzie pasivă: ionii pozitivi vor difuza (fluxul lor prin membrană este diferit de zero) până când potenţialul electric dezvoltat între compartimentele (I) şi (II) este suficient de mare, încât forţa electrică ce acţionează asupra ionilor pozitivi în membrană suprimă tendinţa lor de a se mişca ordonat între cele două compartimente, în virtutea gradientului de concentraţie.

Notând prin $u^+ = z^+ q_e B^+$ mobilitatea electrică a ionilor difuzanţi şi folosind relaţia lui Einstein pentru valoarea coeficientului de difuzie $D^+ = kTB^+$, putem scrie:

$$J^+ = -u^+ \frac{kT}{z^+ q_e} \frac{dC^+}{dx} - u^+ C^+ \frac{d\Psi}{dx} \qquad (10.27)$$

Multiplicând primul termen din partea dreaptă a expresiei de mai sus prin $\frac{N_A}{N_A}$ (N_A este numărul lui Avogadro) şi utilizând egalităţile:

$$\begin{aligned} R &= N_A k \\ F &= N_A q_e \end{aligned} \qquad (10.28)$$

expresia de mai sus devine:

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

$$J^+ = -u^+ \frac{RT}{z^+F}\frac{dC^+}{dx} - u^+C^+\frac{d\Psi}{dx} \qquad (10.29)$$

sau, într-o formă echivalentă:

$$J^+ = -u^+C^+\left\{\frac{RT}{z^+F}\frac{d\ln C^+}{dx} + \frac{d\Psi}{dx}\right\} \qquad (10.30)$$

Starea de echilibru în procesul de difuzie sub acțiunea gradientului de concentrație și a forței electrice presupune anularea valorii fluxului J^+. Deci:

$$\frac{RT}{z^+F}\frac{d\ln C^+}{dx} + \frac{d\Psi}{dx} = 0 \qquad (10.31)$$

Integrând această expresie între compartimentele (I) și (II), obținem:

$$\frac{RT}{z^+F}\int_{C_I^+}^{C_{II}^+} d\ln C^+ = -\int_{\Psi_I}^{\Psi_{II}} d\Psi \qquad (10.32)$$

sau, echivalent:

$$\Psi_I - \Psi_{II} = -\frac{RT}{z^+F}\ln\left(\frac{C_I^+}{C_{II}^+}\right) = V_{eq.}^+ \qquad (10.33)$$

Expresia de mai sus este bine-cunoscuta relație a lui Nernst, ce exprimă diferența de potențial ce apare între compartimentele (I) și (II), în momentul în care starea de echilibru în procesul de difuzie al ionilor difuzanți a fost atinsă.

Cu alte cuvinte, diferența de potențial dată de relația lui Nernst este valoarea diferenței de potențial ce trebuie stabilită între cele două compartimente astfel încât fluxul ionilor difuzanți să fie nul.

Diferența de potențial Nernst dedusă pentru o specie ionică difuzantă se mai numește potențialul de echilibru ($V_{eq.}^+$) al ionului difuzant respectiv.

10.4. *Circuitul electric echivalent al unei membrane cu proprietăți de semipermeabilitate ionică*

Utilizând expresia ce dă valoarea fluxului ionilor difuzanți printr-o membrană semipermeabilă (10.29), putem exprima curentul electric datorat difuziei acestor ioni astfel (I^+):

$$I^+ = -Fz^+u^+C^+\left\{\frac{RT}{z^+F}\frac{d\ln C^+}{dx} + \frac{d\Psi}{dx}\right\} \qquad (10.34)$$

BCU MIRCEA CEL BĂTRÂN UNIVERSITY LIBRARY

sau, în formă echivalentă:

$$\frac{I^+}{Fz_+u^+C^+} = -\left\{\frac{RT}{z^+F}\frac{d\ln C^+}{dx} + \frac{d\Psi}{dx}\right\} \qquad (10.35)$$

Multiplicând această expresie cu dx, şi integrând-o între cele două compartimente de-a lungul membranei semipermeabile, de grosime h, rezultă:

$$I^+\int_0^h \frac{dx}{Fz^+u^+C^+} = \frac{RT}{z^+F}\ln\left(\frac{C_I^+}{C_{II}^+}\right) + \Psi_I - \Psi_{II} \qquad (10.36)$$

Notând prin $R^+ = \int_0^h \frac{dx}{Fz^+u^+C^+}$ rezistenţa electrică a membranei semipermeabile pentru ionul difuzant, putem scrie:

$$I^+ = \frac{\left(V - V_{eq.}^+\right)}{R^+} \qquad (10.37)$$

unde:

$$V = \Psi_I - \Psi_{II} \qquad (10.38)$$

$$V_{eq.}^+ = -\frac{RT}{z^+F}\ln\frac{C_I^+}{C_{II}^+}$$

Cu ajutorul acestei ultime expresii, putem reprezenta electric membrana semipermeabilă pentru ionul difuzant pozitiv astfel:

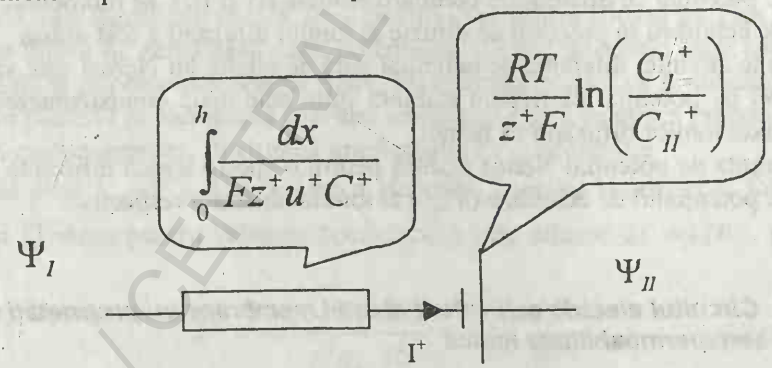


Fig. 48. Schema electrică echivalentă a unei membrane semipermeabile, care constă dintr-un rezistor înseriat cu o sursă de tensiune

În figura de mai sus, C^* reprezintă concentraţia ionilor pozitivi prin membrana de grosime h, şi care este o funcţie dependentă de distanţa x în membrană (vezi mai jos - *Capitolul 11*).

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

10.5. *Potențialul Donnan*

În paragraful precedent am analizat proprietățile electrice ale unei membrane biologice, ce rezultă din caracterul său de permeabilitate selectivă pentru diferiți ioni. Există însă situații practice, în care dezvoltarea unei diferențe de potențial electric între două compartimente cu concentrații ionice diferite nu depinde de proprietățile de semipermeabilitate ale regiunii de interfață între ele. Experimental, această diferență de potențial se pune în evidență cel mai simplu prin plasarea unui microelectrod de sticlă, umplut cu soluție de KCl (3M), într-un compartiment cu concentrație diferită a KCl (de ex., 0.5 M).

Datorită gradientului de concentrație, ionii de K^+ și Cl^- vor difuza din mediul conținut în microelectrod spre compartimentul în care concentrația lor este mai mică; având în vedere însă că mobilitățile electrice ale celor două specii ionice în apă sunt ușor diferite ($u_{Cl}/u_K \sim 1.03$), în cursul procesului de difuzie se va stabili o diferență de concentrație ionică a ionilor de K^+ și Cl^- într-o zonă limitată, așezată simetric în planul de separație dintre cele două medii (Fig. 49).

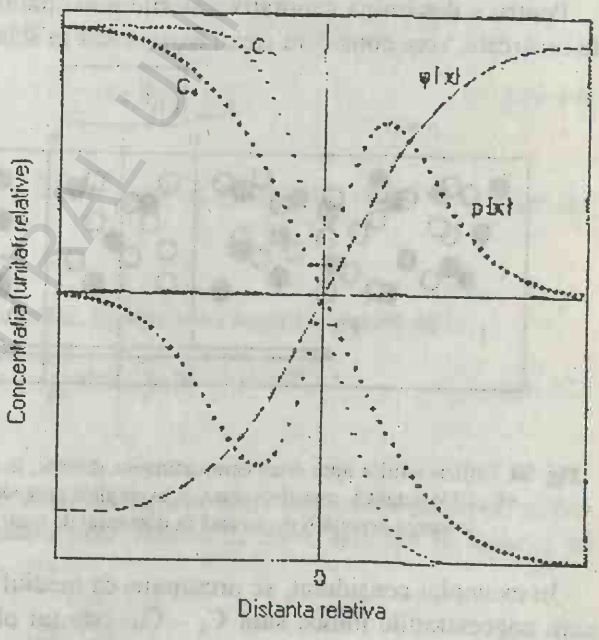


Fig. 49. Diagrama ce ilustrează stabilirea unei sarcini electrice spațiale nenule în vecinătatea suprafeței de separație (în cazul ideal, planul ce trece prin punctul de coordonată 0) între două medii în care concentrațiile anionilor (C_-) și cationilor (C_+) sunt diferite; acest proces are loc datorită diferenței de mobilitate electrică a celor două specii ionice în zona de separație între cele două medii

Această diferență de concentrații ale speciilor ionice în regiunea de tranziție între cele două medii va determina apariția unei sarcini electrice nete diferite de zero ($\rho(x)$ - Fig. 49), și deci implicit apariția unui câmp electric. Diferența de potențial între cele două medii derivată din câmpul electric definit mai sus, care apare într-un sistem aflat

în stare de neechilibru şi care datorează existenţa diferenţei de mobilitate electrică a ionilor difuzanţi, se numeşte potenţial de difuzie ($\Psi(x)$ - Fig. 49). Spre deosebire de potenţialul de tip Nernst, potenţialul de difuzie are caracter tranzient, şi descreşte în magnitudine pe măsură ce concentraţiile ionilor difuzanţi se egalizează în timp, între cele două compartimente.

Putem conchide că un asemenea proces, denumit proces de electrodifuzie, este caracterizat de două clase principale de procese:

a. un proces iniţial de încărcare, caracterizat de dezvoltarea unui câmp electric şi a unui transfer de sarcină electrică netă diferită de zero prin zona de tranziţie dintre cele două compartimente, cuantificat prin timpul de încărcare τ_q

b. un proces de difuzie, caracterizat de timpul de redistribuţie τ_{red}, ce conduce la diminuarea valorii magnitudinii câmpului electric dezvoltat în procesul (a) prin micşorarea gradientului de concentraţie între cele două compartimente, şi care se produce fără transfer de sarcină netă electrică prin zona de tranziţie.

Pentru a determina cantitativ valorile potenţialului de difuzie şi ale timpului de încărcare, vom considera cazul reprezentat în schiţa de mai jos.

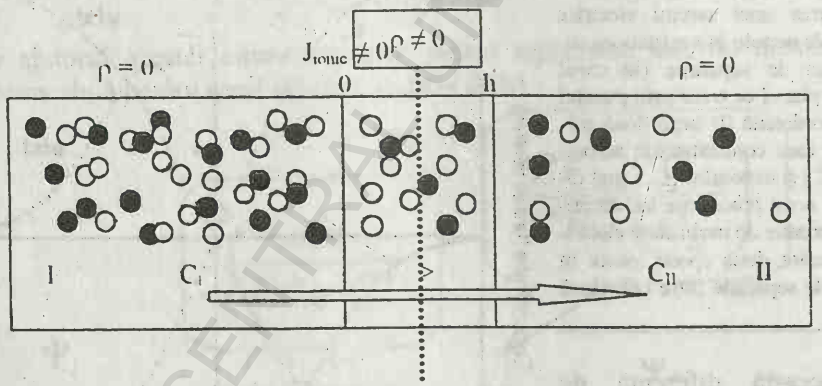


Fig. 50. Difuzia ionilor între două compartimente diferite, în care concentraţiile lor sunt diferite ($C_I > C_{II}$). De notat că, spre deosebire de exemplele precedente, în acest caz se consideră că valoarea densităţii de sarcină în domeniul de tranziţie este diferită de zero

În exemplul considerat, se presupune că mediul ce separă compartimentele în care concentraţiile ionice sunt $C_I > C_{II}$ este un plan, reprezentat în Fig. 50 de linia punctată (ca în cazul idealizat din Fig. 49). Astfel, în compartimentul (I), concentraţiile ionilor pozitivi (•) şi negativi (○) sunt mai mari decât în compartimentul (II). Iniţial, în cele două compartimente este respectată condiţia de cvasi-

neutralitate ($\rho_{\text{ioni pozitivi}} = \rho_{\text{ioni negativi}}$). Dacă însă mobilitățile electrice ale celor două specii ionice considerate (K^+ și Cl^-) sunt diferite ($u_{Cl}/u_K \sim 1.03$ – vezi și mai sus), ionii de Cl^- vor difuza între cele două compartimente mai repede decât ionii de K^+. Așadar, rezultatul net al acestei diferențe de mobilitate electrică va fi că în regiunea de tranziție între cele două compartimente precum și pe o distanță finită în ambele compartimente, măsurată de la linia de separație în cele două compartimente, condiția de cvasi-neutralitate nu va mai fi respectată ($\rho_{\text{ioni pozitivi}} \neq \rho_{\text{ioni negativi}}$) (vezi și Fig. 49), fapt ce conduce la dezvoltarea unui câmp electric local între cele două medii.

Valoarea fluxului net al ionilor pozitivi ce difuzează între cele două compartimente, pentru cazul unidimensional, este dată de (vezi relațiile din paragraful precedent):

$$\vec{J}^+ = -\frac{RT}{F} grad(u^+C^+) + (u^+C^+)\vec{E} \qquad (10.39)$$

(semnificația mărimilor de mai sus este aceeași ca în paragraful precedent).

Utilizând legea de conservare a masei,

$$\frac{\partial C^+}{\partial t} = -div\vec{J}^+ \qquad (10.40)$$

putem scrie:

$$\frac{\partial C^+}{\partial t} = \frac{RT}{F} div(grad U^+) - div(U^+\vec{E}) \qquad (10.41)$$

unde $U = u^+C^+$.

Pe baza unui raționament identic, pentru ionii negativi putem scrie:

$$\frac{\partial C^-}{\partial t} = \frac{RT}{F} div(gradW) + div(W\vec{E}) \qquad (10.42)$$

unde $W = u^-C^-$.

Câmpul electric ce apare în zona de tranziție între compartimentele (I) și (II), ca urmare a apariției unei sarcini nete diferite de zero, este dat de ecuația lui Poisson:

$$div(\vec{E}) = \frac{\rho}{\varepsilon} \qquad (10.43)$$

unde $\rho = F(C^+ - C^-)$ este densitatea de sarcină în zona tranzițională, iar ε este permitivitatea electrică absolută a mediului în care are loc procesul de difuzie.

BCUAIC CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Rezultă deci forma echivalentă a ecuației lui Poisson:

$$(C^+ - C^-) = \frac{div(\varepsilon \vec{E})}{F} \qquad (10.44)$$

Diferențiind ecuația de mai sus în raport cu timpul, deducem în continuare:

$$\frac{\partial(C^+ - C^-)}{\partial t} = \frac{\partial\left\{div(\varepsilon \vec{E})\right\}}{\frac{\partial t}{F}} = \frac{div\left\{\frac{\partial(\varepsilon \vec{E}}{\partial t}\right\}}{F} \qquad (10.45)$$

Utilizând expresiile deduse mai sus pentru derivatele în raport cu timpul ale concentrațiilor ionilor pozitivi şi negativi în zona de tranziție (10.41, 10.42), putem scrie ecuația de mai sus (10.45) astfel:

$$div\left\{\frac{\partial(\varepsilon \vec{E})}{\partial t}\right\} = RTdiv(grad(U - W)) - div\left\{(U + W)F\vec{E}\right\} \qquad (10.46)$$

sau:

$$div\left\{\frac{\partial(\varepsilon \vec{E})}{\partial t} + F(U + W)\vec{E} - RTgrad(U - W)\right\} = 0 \qquad (10.47)$$

De aici rezultă:

$$\frac{\partial(\varepsilon \vec{E})}{\partial t} + F(U + W)\vec{E} - RTgrad(U - W) = A(t) \qquad (10.48)$$

În ecuația de mai sus, A(t) este o constantă de integrare dependentă de timp deoarece, aşa cum am subliniat mai sus, în cursul acestor procese de difuzie, valoarea câmpului electric dezvoltat în domeniul limitat de 0 şi h este variabilă în timp. Presupunând că la începutul procesului de difuzie câmpul electric în zona de tranziție este nul, putem egala A(t) cu zero.

O altă presupunere necesară pentru rezolvarea ecuației de mai sus este că, în timpul în care câmpul electric se dezvoltă în zona de tranziție, variația concentrațiilor în cele două compartimente este nulă. Matematic, putem scrie această condiție astfel:

$$\frac{d(grad(U - W))}{dt} = 0 \qquad (10.49)$$

pentru $t < \tau_q$.

În aceste condiții, soluția ecuației diferențiale de mai sus este:

$$\vec{E}(t) = \frac{RT}{F}\frac{grad(U-W)}{U+W}\left[1-\exp\left\{-\frac{F(U+W)t}{\varepsilon}\right\}\right] \qquad (10.50)$$

Deci, câmpul electric local din regiunea de tranziție va atinge valoarea maximă:

$$\vec{E} = \frac{RT}{F}\frac{grad(U-W)}{U+W} \qquad (10.51)$$

iar timpul de încărcare τ_q este dat de:

$$\tau_q = \frac{\varepsilon}{F(U+W)} \qquad (10.52)$$

Menționăm iarăși că, în cazul difuziei unidimensionale (doar în lungul axei x, de exemplu), vectorul câmp electric de mai sus are doar componentă nenulă pe axa x.

Fără a intra în detalii numerice, nu trebuie uitat că în cazul sistemelor biofizice macroscopice obișnuite, timpii de încărcare ($\tau_q \sim$ ns) și cel de re-distribuție ($\tau_{red} \sim$ h) diferă cu multe ordine de mărime, astfel încât cele două procese (de încărcare și redistribuție) pot fi considerate ca fiind bine separate în timp.

Trebuie reamintit că la sfârșitul timpului de încărcare, diferența de potențial maximă între cele două compartimente va avea o asemenea valoare, încât ionii pozitivi și negativi vor difuza prin zona tranzițională cu aceeași rată iar în aceste condiții curentul total de difuzie devine egal cu zero, cu alte cuvinte, *se poate aprecia că în acest caz, valorile concentrațiilor ionilor pozitivi și negativi în domeniul delimitat de $0 < x < h$ sunt egale.*

(Trebuie subliniat că în cadrul teoriei expuse mai sus, concentrațiile ionice sunt exprimate în mol m^3 iar F este numărul lui Faraday egal cu $N_A e$.)

Dacă pentru scopul de a determina valoarea maximă a diferenței de potențial electric local din regiunea de tranziție se consideră că în zona tranzițională ($0 < x < h$) condiția de electroneutralitate este aproximativ satisfăcută (vezi mai sus), se pot înlocui în aceste condiții valorile mărimilor U și W în expresia de mai sus ($U(x) = u^+ C^+(x)$, $W(x) = u^- C^-(x)$ și $C^-(x) = C^-(x) = C(x)$ pentru $0 < x < h$).

În aceste condiții rezultă că valoarea maximă a diferenței de potențial electric între cele două compartimente este dată de soluția ecuației:

$$-\frac{d\Psi}{dx} = \frac{RT}{F}\frac{u^+ - u^-}{u^+ + u^-}\frac{1}{C}\frac{dC}{dx} \qquad (10.53)$$

BCU IAȘI ... UNIVERSITY LIBRARY

Multiplicând această ecuație cu dx, și integrând-o prin zona tranzițională ($0< x < h$), unde la $x = 0$, $\Psi(x) = \Psi(o) = \Psi^{(I)}$ și $C(x) = C(0) = C^{(I)}$ iar la la $x = h$ $\Psi(x) = \Psi(h) = \Psi^{(II)}$ și $C(x) = C(h) = C^{(II)}$, rezultă:

$$\Psi^{(I)} - \Psi^{(II)} = V_{difuzie} = \frac{RT}{F}\frac{u^+ - u^-}{u^+ + u^-}\ln\left(\frac{C^{(II)}}{C^{(I)}}\right) \qquad (10.54)$$

Din această expresie a potențialului de difuzie, se observă că polaritatea electrică a fazei (I) în raport cu faza (II) depinde de ionul cu cea mai mare mobilitate; astfel, dacă $u^+ > u^-$, atunci $\Psi^{(II)} > \Psi^{(I)}$ și invers.

Trebuie reținut că expresia potențialului de difuzie poate căpăta valori apreciabile (de ordinul zecilor de milivolți) în majoritatea situațiilor experimentale în care se utilizează diferiți electrozi pentru detectarea și măsurarea biopotențialelor celulare sau a curenților electrici trans-membranari. Pentru a evita interferențele nedorite între acest potențial de difuzie și alte diferențe de potențial exogene aplicate unui sistem de studiu sau a diferențelor de potențial celular măsurate, instrumentele de măsură moderne ale curenților și/sau ale diferențelor de potențial în sistemele biofizice sunt prevăzute cu module electronice care, cu ajutorul unui sistem comandat de un microprocesor, măsoară valoarea potențialului de difuzie și apoi suprapun în sistemul studiat o diferență de potențial numeric egală cu potențialul Donnan și de semn schimbat. În acest fel, valoarea finală a diferenței de potențial electric Donnan va fi nulă.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

11. Ecuația lui Goldman. Reprezentarea electrică echivalentă a unei membrane biologice permeabile pentru mai multe specii ionice

Ecuația lui Goldman este rezultatul unui tratament fenomenologic extensiv aplicat unei membrane biologice semipermeabile, care spre deosebire de exemplul utilizat la deducerea ecuației lui Nernst, este permeabilă pentru mai multe specii ionice.

Pentru a ajuta înțelegerea formalismului lui Goldman, vom reduce analiza ecuațiilor de difuzie ionică pe o membrană biologică cu proprietăți de semipermeabilitate, așa cum este reprezentată schematic mai jos:

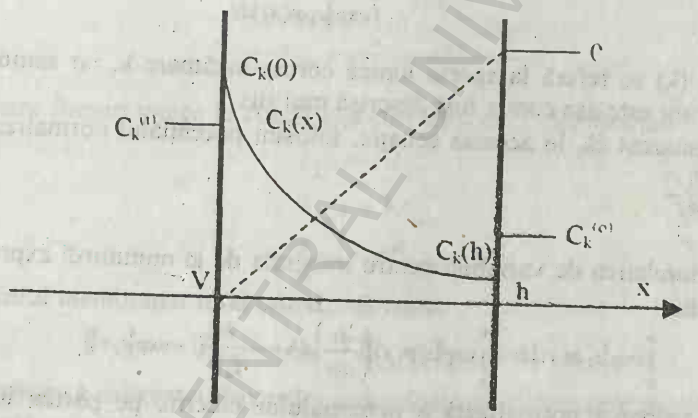


Fig. 51. Reprezentarea schematizată a variației concentrației speciei ionice k și a potențialului electric, $\Psi(x)$, printr-o biomembrană, în cadrul formalismului lui Goldman

În schița de mai sus, semnificația mărimilor este următoarea:

– $\Psi(x)$ este valoarea potențialului electric prin membrană, și care se presupune că are o variație liniară în acest formalism

– V este valoarea potențialului electric pe partea internă a membranei; pe partea externă se alege V=0 (de exemplu, partea externă a membranei este conectată la masa instrumentului de măsură)

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

– h este grosimea membranei biologice
– $C_k^{(i)}$ respectiv $C_k^{(o)}$ sunt concentraţiile speciei ionice (k) în domeniul intern şi extern al membranei
– $C_k(x)$ este valoarea concentraţiei speciei ionice (k) prin membrană, şi care are o distribuţie diferită de cea liniară
– $C_k(0)$ şi $C_k(h)$ sunt valorile concentraţiei speciei ionice (k) în imediata vecinătate a suprafeţelor de separaţie a membranei de mediile externe, respectiv interne. Se presupune că datorită interacţiunilor specifice ion-membrană, aceste concentraţii nu sunt riguros identice cu $C_k^{(i)}$, respectiv $C_k^{(o)}$ ci sunt date de relaţiile: $C_k(0) = \alpha_k C_k^{(i)}$ şi $C_k(h) = \alpha_k C_k^{(o)}$ (α_k se numeşte coeficient de distribuţie între faza apoasă şi lipidică a speciei ionice k).

Pentru deducerea ecuaţiei lui Goldman, vom utiliza o formă echivalentă a ecuaţiei lui Kramer (vezi paragrafele precedente):

$$J_k = D_k \frac{C_k(0)\exp\left\{z_k\varphi^{(i)}\right\} - C_k(h)\exp\left\{z_k\varphi^{(o)}\right\}}{\int_0^h \exp\left\{z_k\varphi(x)\right\}dx} \qquad (11.1)$$

unde indicele (k) se referă la specia ionică corespunzătoare k, iar semnificaţia celorlalte mărimi este aşa cum a fost descrisă mai sus.

Trebuie remarcat că, în această ecuaţie, folosim potenţialul normalizat $\varphi(x)$, unde $\varphi(x) = \frac{\Psi(x)}{\frac{RT}{F}}$.

Făcând schimbarea de variabilă pentru integrala de la numitorul expresiei de mai sus, rezultă:

$$\int_0^h \exp\left\{z_k\varphi(x)\right\}dx = \int_v^0 \exp\left\{z_k\varphi(x)\right\}\left(\frac{dx}{d\varphi}\right)d\varphi = -\frac{h}{z_k v}\left(1-\exp\left\{z_k v\right\}\right) \qquad (11.2)$$

unde v este valoarea normalizată a potenţialului electric pe partea internă a membranei, $v = \frac{V}{\frac{RT}{F}}$.

În aceste condiţii, ecuaţia lui Kramer (cum a fost exprimată mai sus), şi care descrie cantitativ fluxul speciei ionice (k) prin membrana biologică în condiţiile experimentale date, devine:

$$J_k = z_k v\left(\frac{D_k}{h}\right)\frac{C_k(h) - C_k(0)\exp\left\{z_k v\right\}}{1-\exp\left\{z_k v\right\}} \qquad (11.3)$$

Introducând în această expresie valorile concentraţiilor interne şi externe membranei (a se vedea definiţiile de mai sus), obţinem:

$$J_k = z_k P_k \frac{v}{1-\exp\{z_k v\}} \left\{ C_k^{(o)} - C_k^{(i)} \exp\{z_k v\} \right\} \qquad (11.4)$$

unde P_k se numește coeficient de permeabilitate al speciei ionice (k) și este definit astfel:

$$P_k = \frac{\alpha_k D_k}{h} \qquad (11.5)$$

Presupunând că membrana biologică este permeabilă în principal pentru ionii de K^+, Na^+ și Cl^- (situația cel mai des întâlnită în cazul celulelor excitabile), putem scrie următorul set de ecuații pentru fluxurile acestor specii ionice prin membrană:

$$\begin{aligned} J_K &= P_{K^+} v \frac{C_{K^+}^{(o)} - C_{K^+}^{(i)} e^v}{1-e^v} \\ J_{Na} &= P_{Na^+} v \frac{C_{Na^+}^{(o)} - C_{Na^+}^{(i)} e^v}{1-e^v} \\ J_{Cl} &= -P_{Cl^-} v \frac{C_{Cl^-}^{(i)} - C_{Cl^-}^{(o)} e^v}{1-e^v} \end{aligned} \qquad (11.6)$$

Acestor fluxuri ionice le corespund curenții ionici membranari:

$$\begin{aligned} I_{K^+} &= F J_{K^+} \\ I_{Na^+} &= F J_{Na^+} \\ I_{Cl^-} &= -F J_{Cl^-} \end{aligned} \qquad (11.7)$$

Curentul membranar total este dat de suma:

$$I_{total} = I_{K^+} + I_{Na^+} + I_{Cl^-} \qquad (11.8)$$

Ca urmare a existenței fluxurilor individuale de curent prin membrana celulară naturală, mediate de ionii de K^+, Na^+ și Cl^-, distribuția de sarcina netă de o parte și de alta a membranei celulare se modifică continuu. Odată cu aceasta se va modifica și valoarea diferenței de potențial transmembranar. În cazul în care diferența de potențial transmembranar are o asemenea valoare încât curentul total transmembranar este nul ($I_{total} = 0$), spunem că sistemul a atins starea de staționaritate. Utilizând formulele deduse mai sus și punând condiția $I_{total} = 0$, rezultă că valoarea diferenței de potențial de staționaritate este dată de:

$$V_m = v_m \frac{RT}{F} = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_{K^+} C_{K^+}^{(o)} + P_{Na^+} C_{Na^+}^{(o)} + P_{Cl^-} C_{Cl^-}^{(i)}}{P_{K^+} C_{K^+}^{(i)} + P_{Na^+} C_{Na^+}^{(i)} + P_{Cl^-} C_{Cl^-}^{(o)}} \qquad (11.9)$$

unde v_m este valoarea potențialului redus pentru care $I_{total} = 0$.

BCU CLUJ / UNIVERSITY LIBRARY

Această expresie a fost dedusă în 1949 de Hodgkin şi Katz şi este cunoscută astăzi sub denumirea de ecuaţia lui Goldman – Hodgkin – Katz, iar presupunerea esenţială făcută a fost liniaritatea variaţiei potenţialului prin membrana celulară.

Trebuie reţinut că, în teorii mai elaborate ce descriu mai riguros rezultatele experimentale observate din măsurarea proprietăţilor electrice ale membranelor celulare, potenţialul nu se considera a fi o funcţie liniară în raport cu distanţa prin membrană. În funcţie de complexitatea modelului ales şi utilizarea riguroasă a legii lui Poisson scrisă pentru mediul inter-membranar pe unde are loc transferul ionic, se pot genera diferite forme ale variaţiei potenţialului membranar cu distanţa în membrană. Teoria prezentată mai sus reprezintă una din cele mai simple şi des utilizate paradigme ale transportului transmembranar şi care, în ciuda simplităţii şi a ipotezelor simplificatoare pe care le presupune (e.g., variaţia liniară a potenţialului prin membrană; independenţa fluxurilor ionice unele în raport cu altele, excluderea fenomenelor electrice de la interfaţa membrana biologică–electrolit inter- sau extra-celular), produce rezultate foarte consistente cu observaţiile experimentale.

Trebuie subliniat că ecuaţia lui Goldman – Hodgkin – Katz reproduce valori ale diferenţei de potenţial de repaus trans-membranar foarte apropiate cu cele măsurate experimental (~ -70 mV, în funcţie de sistemul celular considerat).

În tabelul de mai jos sunt prezentate valorile potenţialelor de echilibru Nernst pentru cele trei specii ionice importante în stabilirea diferenţei de potenţial trans-membranare:

Tabel 8. Valorile potenţialelor de echilibru Nernst pentru cele trei specii ionice importante în stabilirea diferenţei de potenţial trans-membranare

Ion	Concentraţia extracelulară (mM)	Concentraţia intracelulară (mM)	$\frac{[ion]_e}{[ion]_i}$	Potenţial de echilibru Nernst (mV)
Na^+	145	12	12	+67
K^+	4	155	0.026	-98
Cl^-	123	4.2	29	-90

După cum poate fi uşor remarcat, diferenţa de potenţial de repaus trans-membranar NU este egală cu nici unul din potenţialele Nernst pentru cele trei tipuri de ioni mai importante ce generează activitatea electrică celulară. În consecinţă, chiar dacă starea de STAŢIONARITATE a fost atinsă ($I_{total} = 0$), aceasta nu implică ECHILIBRU pentru fluxurile ionice individuale. Conform ecuaţiei lui Nernst aplicată pentru fiecare din cele trei specii ionice, în condiţii de staţionari-

tate vor exista fluxuri ionice individuale diferite de zero. În timp, evoluția sistemului celular dictată de existența fluxurilor ionice individuale va fi spre egalizarea concentrațiiilor ionice în mediile inter- și extra-celulare, ce va determina o diferență de potențial trans-membranară nulă. Modificări dramatice ale diferenței de potențial trans-membranar, până la anularea sa, înseamnă moartea electrică a celulei; ea nu va mai putea transmite sau primi informație prin intermediul potențialelor de acțiune. În sens evolutiv, soluția Naturii în rezolvarea acestei probleme a fost apariția pompei ionice electrogene de Na^+ - K^+ care, după cum a fost prezentat detaliat în unul din paragrafele precedente, utilizează energia conținută în moleculele macroergice de ATP pentru transportul activ, împotriva gradientului de concentrație, a ionilor de Na^+ în exteriorul celulei și a celor de K^+ în mediul inter-celular. În acest fel este menținut gradientul de concentrație ionică transmembranară, ce este esențial în comportamentul electric al celulelor vii.

11.1. *Variația concentrației ionilor difuzanți prin membrana celulară. Schița electrică echivalentă a unei membrane permeabile pentru mai multe specii ionice*

Utilizând ecuația lui Kramer scrisă într-un mod echivalent, rezultă că valoarea fluxului speciei ionice (k) printr-o membrană semipermeabilă este:

$$-\frac{J_k}{D_k}\exp\{z_k\varphi(x)\}dx = -\frac{J_k}{D_k}\exp\{z_k\varphi(x)\}\frac{dx}{d\varphi}d\varphi = d(C_k(x)\exp\{z_k\varphi(x)\}) \qquad (11.10)$$

Presupunând că (vezi și în paragraful precedent) potențialul electric variază liniar prin membrana celulară ($\frac{d\varphi}{dx} = -\frac{v}{h}$) și integrând ecuația de mai sus între cele două fețe (de la x = 0 la x = h) ale membranei (utilizând exact aceleași notații că și în paragraful precedent), reiese:

$$\frac{hJ_k}{z_kD_kv}(1-\exp\{z_kv\}) = (C_k^{(o)} - C_k^{(i)}\exp\{z_kv\})\alpha_k \qquad (11.11)$$

Dacă integrarea se face între un punct oarecare în membrană (x), unde potențialul normalizat este φ(x) și concentrația speciei ionice (k) este $C_k(x)$, și mediul exterior (x = h), rezultă:

$$\frac{hJ_k}{z_kD_kv}(1-\exp\{z_k\varphi(x)\}) = \alpha_kC_k^{(o)} - C_k(x)\exp\{z_k\varphi(x)\} \qquad (11.12)$$

Împărțind aceste ultime două ecuații (11.11, 11.12), se obține:

$$\frac{1-\exp\{z_k\varphi(x)\}}{1-\exp\{z_k v\}}=\frac{\alpha_k C_k^{(o)}-C_k(x)\exp\{z_k\varphi(x)\}}{(C_k^{(o)}-C_k^{(i)}\exp\{z_k v\})\alpha_k} \qquad (11.13)$$

Înlocuind în această ecuație pe φ(x) cu $v(1-\frac{x}{h})=\frac{FV(1-\frac{x}{h})}{RT}$ şi rezolvând-o în raport cu necunoscuta $C_k(x)$, rezultă o relație ce dă informații despre profilul de variație a concentrației speciei ionice (k) prin membrana celulară:

$$C_k(x)=\alpha_k\frac{C_k^{(i)}\exp\left\{\frac{z_kFV}{RT}\right\}-C_k^{(o)}-\left[C_k^{(i)}-C_k^{(o)}\right]\exp\left\{\frac{z_kFVx}{RTh}\right\}}{\exp\left\{\frac{z_kFV}{RT}\right\}-1} \qquad (11.14)$$

Este astfel justificată afirmația din modelul utilizat în paragraful precedent, referitor la neliniaritatea formei curbei ce dă variație concentrației speciei ionice (k) prin membrana celulară.

Pentru a deduce schița electrică echivalentă a unei membrane permeabile pentru mai multe specii ionice, utilizăm una din formulele dezvoltate înainte ce descrie curentul electric trans-membranar al speciei ionice (k):

$$I_k=\frac{(z_kF)^2P_kV(C_k^{(o)}-C_k^{(i)}\exp\left\{\frac{z_kFV}{RT}\right\})}{RT(1-\exp\left\{\frac{z_kFV}{RT}\right\})} \qquad (11.15)$$

Această ecuație poate fi pusă uşor în forma generală $I_k=G_k(V-V_k^{(eq.)})$, unde V este valoarea diferenței de potențial trans-membranar iar $V_k^{(eq.)}$ este potențialul Nernstian al speciei ionice (k):

$$I_k=\frac{(z_kF)^2P_kV(C_k^{(o)}-C_k^{(i)}\exp\left\{\frac{z_kFV}{RT}\right\})}{RT(1-\exp\left\{\frac{z_kFV}{RT}\right\})(V-V_k^{(eq.)})}(V-V_k^{(eq.)}) \qquad (11.16)$$

Deci, expresia conductanței electrice pentru transportul speciei ionice (k) este de forma:

$$G_k=\frac{(z_kF)^2P_kV(C_k^{(o)}-C_k^{(i)}\exp\left\{\frac{z_kFV}{RT}\right\})}{RT(1-\exp\left\{\frac{z_kFV}{RT}\right\})(V-V_k^{(eq.)})} \qquad (11.17)$$

BCU IAŞI / CENTRALA UNIVERSITARĂ LIBRARY

Reprezentând curenții ionici dați de fluxurile individuale și independente prin membrana celulei considerate ca mai sus ($I_k = G_k(V - V_k^{(eq.)})$), putem vizualiza circuitul electric echivalent al unei membranei celulare astfel:

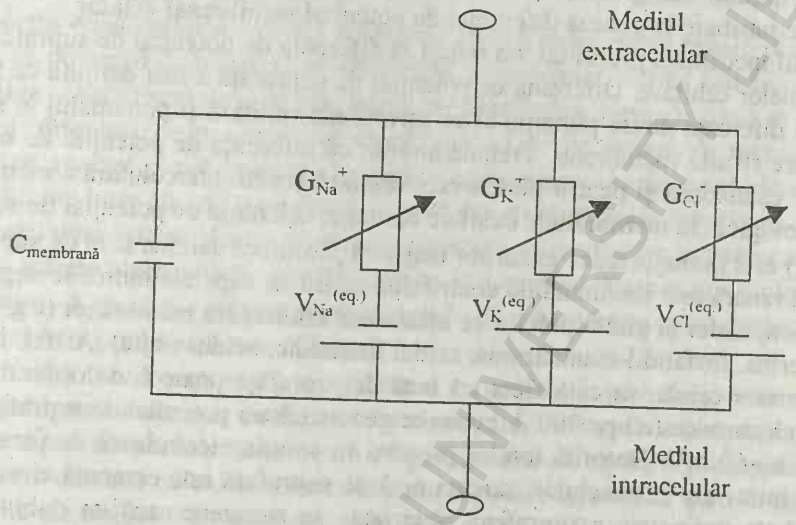


Fig. 52. Schema electrică echivalentă a unei membrane semipermeabile pentru trei specii ionice (i.e., sodiu, potasiu și clor), dedusă în cadrul formalismului Goldman – Hodgkin – Katz

Pentru a simplifica exprimarea grafică și a surprinde totuși caracteristicile esențiale ale unei membrane biologice, semipermeabilă doar pentru trei specii ionice distincte, din figura 52 au fost omise reprezentarea rezistenței de scurgere ('leakage') membranară precum și a altor canale ionice sau pompe ionice (Na^+ - K^+ - ATP - aza).

În această schemă electrică echivalentă a unei membrane celulare simplificată, semipermeabilă pentru mai multe specii ionice (sodiu, potasiu și clor), conductantele electrice ce caracterizează macroscopic transportul ionic al celor trei specii de ioni sunt definite ca mai sus și reprezentate prin G_{Na}^+, G_K^+ și G_{Cl}^-. După cum vom arăta într-un capitol ulterior, aceste conductanțe nu au valori constante, ci variază după o anumită formă, dependentă de timp și diferența de potențial trans-membranară; de aceea s-a preferat reprezentarea lor ca elemente de circuit cu conductanță variabilă.

Capacitatea electrică echivalentă a membranei celulare lipidice este reprezentată de C_M, iar potențialele Nernstiene ale celor trei specii ionice de $V_{Na}^{(eq.)}$, $V_K^{(eq.)}$ și $V_{Cl}^{(eq.)}$.

11.2. *Contribuţii electrice locale la formarea diferenţei de potenţial transmembranar al unei membrane biologice*

În conţinutul paragrafelor precedente au fost detaliate două dintre mecanismele ce contribuie la geneza diferenţei de potenţial membranar celular.

Primul mecanism prezentat s-a referit la diferenţa de potenţial de suprafaţă al membranelor celulare. Diferenţa de potenţial de suprafaţă a fost definită ca fiind egală cu diferenţa dintre potenţialul pe membrana celulară şi potenţialul în soluţia în care se află membrana. Trebuie amintit că diferenţa de potenţial de membrană se calculează şi pentru partea extracelulară şi cea intercelulară a membranelor biologice. În membranele celulare naturale, diferenţa de potenţial de suprafaţă (Ψ_s) este în majoritatea cazurilor negativă, deoarece sarcina netă de suprafaţă membranară este dominată de contribuţia adusă de capetele hidrofile negative ale fosfolipidelor şi glicolipidelor ce alcătuiesc arhitectura membranei (e.g., fosfatidilserina, fosfatidil-etanolamina, acidul fosfatidic, acidul sialic). Astfel, în cazul anumitor celule, sarcina electrică netă de suprafaţă poate fi de ordinul unei sarcini electronice (e^-) pe 300 $Å^2$, ceea ce generează un potenţial de suprafaţă de ordinul a –60 mV. Datorită ionilor prezenţi în soluţia electrolitică ce formează mediul intra- sau extracelular, sarcina netă de suprafaţă este ecranată electric şi în imediata vecinatate a suprafeţei electrizate se autogenerează un dublu strat electric. Aplicarea teoriei lui Poisson şi a funcţiei de distribuţie Boltzmann a sarcinilor ionice electrolitice în câmpul electric generat de sarcinile de suprafaţă, conduce la o expresie ce dă dependenţa cantitativă a diferenţei de potenţial de interfaţă în funcţie de distanţa faţă de suprafaţa încărcată electric. Aşa cum am prezentat anterior, diferenţa de potenţial în interfaţa soluţie electrolitică - membrană încărcată electric scade la valoarea $\frac{\Psi_s}{2.718}$ la o distanţă egală cu distanţa Debye-Huckel, caracteristică fiecărei soluţii electrolitice.

O altă componentă a diferenţei de potenţial transmembranar totale a unei membrane biologice (potenţialul de repaus) apare ca o consecinţă a proprietăţii de semipermeabilitate a membranei pentru difuzia pasivă a unor specii ionice. În situaţia în care membrana biologică este semipermeabilă doar pentru o singură specie ionică, diferenţa de potenţial rezultată între mediile separate de membrana semipermeabilă este dată de ecuaţia lui Nernst:

$$V = \Psi_I - \Psi_{II}$$

$$V_{eq.}^{+} = -\frac{RT}{z^+F}\ln\frac{C_I^+}{C_{II}^+} \qquad (11.18)$$

Când membrana celulară are proprietăți de permeabilitate pentru difuzia simultană a mai multor specii ionice, diferența de potențial ce apare în condiții de staționaritate între cele două medii separate de membrană este dată de ecuația Goldman – Hodgkin – Katz (11.9)

Aceste două componente ale diferenței de potențial membranare (i.e., diferența de potențial de interfață și diferențele de potențial Nernst sau Goldman – Hodgkin – Katz) sunt de cele mai multe ori confundate între ele când se discută despre `diferența de potențial de membrană`. Trebuie reținut că mecanismele fizice de apariție și self-control ale acestor componente de potențial membranar sunt diferite între ele: diferența de potențial de interfață apare drept consecință a prezenței unei sarcini electrice nete de încărcare a interfețelor membrană biologică - soluție electrolitică, iar diferențele de potențial Nernst sau Goldman – Hodgkin – Katz sunt generate de fenomenele de transport pasiv ale unor sarcini electrice nete prin membrana celulară.

Cea de-a treia componentă de potențial, ce are rol în stabilirea diferenței de potențial transmembranar total pentru o membrană biologică, se numește potențial de dipol membranar (notat prin ΔV). Conceptual, apariția potențialului de dipol este corelată cu existența momentelor dipolare diferite de zero în capetele hidrofile ale lipidelor ce intră în compoziția membranelor biologice. Notând cu ($\mu^{\perp}$) componenta momentului dipolar conținută în capetele hidrofile ale lipidelor și perpendiculară pe interfața membrană–soluție electrolitică, potențialul de dipol membranar pentru un monostrat al membranei este dat de:

$$\Delta V = 12\pi\mu^{\perp}/A \qquad (11.19)$$

(A este aria transversală a unei molecule lipidice, exprimată în A^2/(moleculă lipidică), $\mu^{\perp}$ este exprimat în unități miliDebye. S-a presupus valoare unitară pentru constanta dielectrică a mediului din capătul lipidic hidrofil).

Trebuie amintit că teorii mai aprofundate ale originii potențialului de dipol membranar iau în considerație existența mai multor componente ale acestuia, date în special de procesele de polarizare a apei la interfața membrană–soluție electrolitică, capetele hidrofile ale lipidelor membranare precum și legăturile C-H ale regiunilor terminale din lanțurile alifatice lipidice membranare.

Cunoașterea și descrierea potențialelor de interfață și de dipol pentru o membrană biologică sunt etape esențiale pentru analiza unor procese celulare ce au ca substrat existența unor interacțiuni electrice. Astfel, procesele de fosforilare a proteinelor membranare, interacțiunile tip ligand – receptor membranar, activită-

ţile enzimelor membranare, procesele de transport ionic activ şi pasiv prin membrane biologice, proprietăţile cinetice ale canalelor ionice (inclusiv 'gating'-ul – vezi capitolele următoare) sunt doar câteva din procesele celulare esenţiale ce depind major de potenţialele de interfaţă şi de dipol.

Este foarte important de subliniat că, prin intermediul metodelor clasice de măsurare a diferenţelor de potenţial transmembranare pentru orice celulă vie, nu se poate determina decât componenta Nernst (sau Goldman – Hodgkin – Katz) a diferenţei de potenţial total transmembranare. Justificarea acestei afirmaţii rămâne drept idee de lucru pentru cititorul avizat, şi se bazează pe înţelegerea completă a fenomenelor electrice membranare descrise până acum.

O caracteristică importantă a diferenţei de potenţial transmembranară, care este de obicei ignorată în multe studii, este modularea sa în amplitudine, la nivel topologic local. Există mai multe mecanisme prin care diferenţa de potenţial **staţionară** (Nernst, Goldman – Hodgkin – Katz sau de dipol) devine **fluctuantă** la nivel membranar local. Închiderea şi deschiderea stochastică a canalelor ionice, procesele de fosforilare-defosforilare a proteinelor membranare, reacţiile de asociere şi disociere ionică la interfaţa membrană – soluţie electrolitică sunt doar câteva dintre fenomenele ce cauzează fluctuaţii locale în amplitudinea diferenţei de potenţial membranară. Fluctuaţiile locale ale diferenţei de potenţial transmembranară au implicaţii deosebit de importante în cuplajul energetic dintre proprietăţile cinetice ale constituienţilor membranari (în special proteinele) şi aceste diferenţe de potenţial. În literatura de specialitate, acest cuplaj energetic se numeşte **cuplaj electroconformaţional intern**. Cuplajul electroconformaţional intern (sau extern – în care diferenţa de potenţial este extrinsecă membranei biologice) este mecanismul evolutiv principal prin care celulele şi organismele reuşesc să detecteze schimbări bruşte în mediul înconjurător, fapt ce are relevanţă pentru supravieţuirea lor. Astfel, după milioane de ani de evoluţie şi adaptare continuă, celulele au căpătat abilitatea de a detecta, descifra, procesa şi genera semnale electrice periodice. Pentru exemplificare, trebuie amintit că rechinii utilizează cuplajul electroconformaţional pentru a detecta variaţii de ordinul nV/cm, peştii electrici folosesc descărcări electrice pentru captura prăzii (sau alungarea agresorilor naturali), iar păsările utilizează cuplajul conformaţional, în care câmpul extrinsec este cel magnetic, pentru navigare pe distanţe foarte mari ($\sim 10^3$ km). Toate aceste abilităţi dobândite evolutiv implică faptul că celulele sunt capabile de a produce câmpuri electrice periodice şi pot răspunde la variaţii de câmp electric sau magnetic externe. O altă trăsătură importantă a sistemelor

celulare este posibilitatea lor de a amplifica semnale electromagnetice slabe, utilizând tocmai cuplajul electro- și magneto -conformațional. Esența acestui fenomen este 'utilizarea' de către celule a dependenței proprietăților cinetice ale canalelor ionice intrinseci celulelor de câmpurile electrice și magnetice externe: amplificarea semnalelor electromagnetice slabe se traduce macroscopic, în anumite condiții fizice, prin amplificarea curenților electrici mediați de aceste canalele ionice aflate în câmpuri electromagnetice oscilante, în cursul unui proces denumit **rezonanță stochastică**.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

12. Neurobiofizică

Scopul general al neurobiofizicii este de a descrie şi explica mecanismele fizice ce fundamentează funcţionarea integrativă a sistemului nervos.

Sistemul nervos include toate ţesuturile neuronale dintr-un organism, în particular cel uman, şi reglează toate aspectele funcţionale ale organismului. Unitatea funcţională de bază a sistemului nervos o constituie neuronul sau celula nervoasă. Milioane de neuroni specializaţi sunt utilizaţi de organism pentru a primi informaţii din mediul extern sau intern al organismului şi de a trimite mai departe informaţii codificate în influxuri nervoase, spre alţi neuroni cu rol în procesarea acestor mesaje sau stocarea lor. Milioane de alţi neuroni sunt utilizaţi de organism în reglarea contracţiei musculare şi în secreţia hormonală. Creierul uman, care reprezintă 'centrul de control' ce primeşte, stochează, calculează, integrează şi transmite informaţie, conţine aproape 10^{12} neuroni şi fiecare dintre ei formează sute până la mii de conexiuni cu alţi neuroni.

Sistemul nervos conţine şi alt tip de celule, numite celule neurogliale, cu rol în separarea şi protecţia neuronilor, în fagocitoză şi reglarea compoziţiei fluidelor interstiţiale. Celulele gliale sunt mult mai numeroase decât neuronii şi reprezintă aproximativ jumătate din volumul sistemului nervos.

12.1. *Elemente de arhitectură a sistemului nervos la organisme superioare*

Există două mari diviziuni ale sistemului nervos: **sistemul nervos central (SNC)** şi **sistemul nervos periferic (SNP)**.

Sistemul nervos central este constituit din creier şi măduva spinării, şi include, pe lângă neuroni, vase sanguine şi diferite tipuri de ţesuturi conective cu rol în susţinerea mecanică a neuronilor şi protecţia lor. SNC este responsabil pentru integrarea, procesarea şi coordonarea informaţiilor senzoriale şi a informaţiilor de comandă motorie. Astfel, neuronii specializaţi în culegerea de date trimit informaţii despre condiţiile din mediul intern şi extern al organismului şi, în concordanţă cu aceste informaţii, SNC-ul 'emite' comenzi motorii pentru controlul activităţii organelor periferice. Creierul este de asemenea sediul funcţiilor supe-

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

rioare ale organismului, cum ar fi: inteligența, memoria, capacitatea de învățare, diferitele stări emotive.

Sistemul nervos periferic include tot țesutul neuronal din afara sistemului nervos central. Astfel, SNP-ul furnizează informații senzoriale către SNC și conduce comenzile motorii 'emise' de SNC spre țesuturile și sistemele celulare periferice. Conducerea informațiilor senzoriale și celor motorii în SNP se face prin intermediul legăturilor multiple de axoni ai neuronilor implicați în aceste procese; aceste legături multiple axonice, împreuna cu vasele sanguine și țesuturile conective atașate, se numesc nervi. Nervii ce formează conexiuni directe cu creierul se numesc nervi cranieni, iar nervii conectați cu măduva spinării se numesc nervi spinali.

Sistemul nervos periferic conține două mari clase de neuroni motori:

1. neuronii motori somatici, care stimulează voluntar (contractă) mușchii scheletali; corpurile acestor neuroni se găsesc în sistemul nervos central
2. neuronii motori autonomi, care inervează țesuturile glandulare, mușchiul cardiac și mușchii netezi. Activitățile acestor neuroni nu sunt plasate la nivel conștient, ci au loc involuntar.

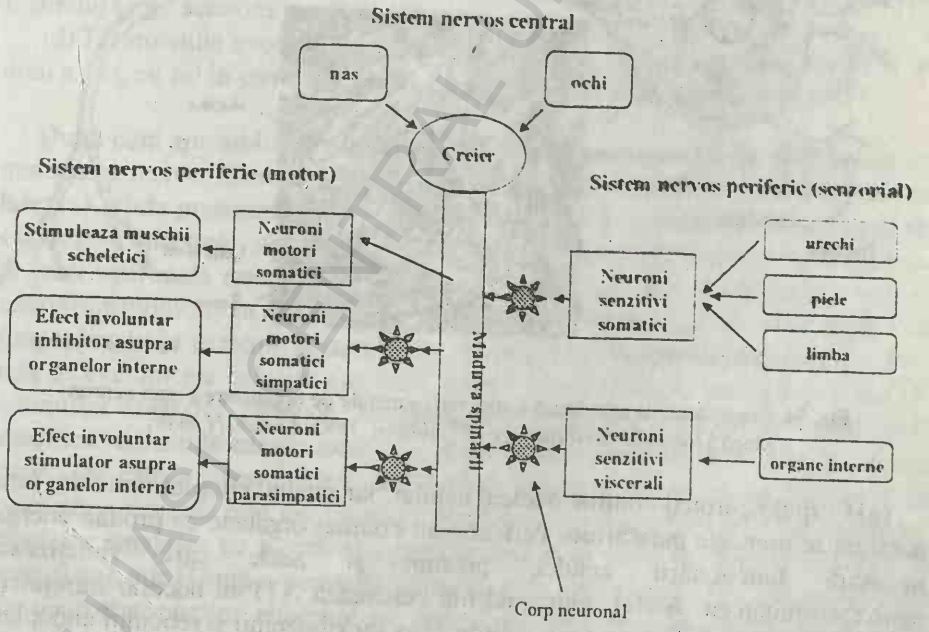


Fig. 53. Diagrama comprehensivă de organizare a sistemului nervos la organismele vertebrate

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Neuronii motori autonomi se clasifică în două clase generale: neuroni motori autonomi **simpatici**, care stimulează ţesutul inervat, şi neuroni motori autonomi **parasimpatici**, care exercită asupra ţesutului inervat un efect contrar. Neuronii senzoriali au corpurile grupate în formaţiuni celulare organizate, denumite ganglioni, situate în afara măduvii spinării. De asemenea, tot în formaţiuni ganglionare se organizează şi corpurile neuronilor motori autonomi.

În Fig. 53 este reprezentată schematic diagrama de organizare a sistemului nervos la organismele vertebrate.

În ciuda complexităţii de ansamblu a sistemului nervos, celulele nervoase sunt foarte bine caracterizate, poate mai bine decât oricare alt tip de celule, în ceea ce priveşte structura şi funcţia lor. Cele mai importante regiuni ale unei celule nervoase şi care au rol funcţional diferit sunt: (a) corpul neuronal, (b) dendritele, (c) axonul şi (d) terminaţiile axonale.

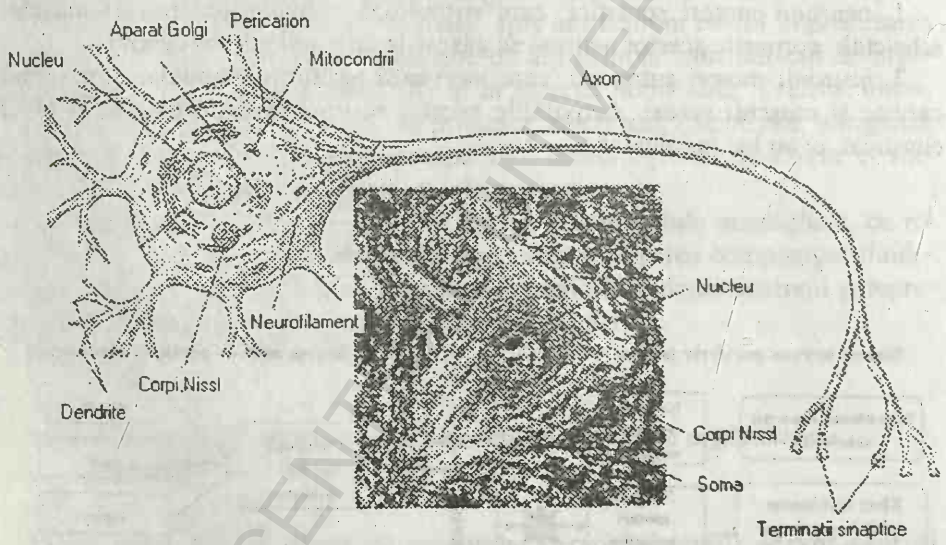


Fig. 54. Reprezentarea anatomică a structurii generale de organizare a unui neuron [după *Molecular Cell Biology (3rd edition), 1995. Lodish, H. et al*]

(a) Corpul neuronal conţine nucleul celular, iar mediul citoplasmatic din jurul acestuia se numeşte pericarion. Pericarionul conţine organele ce produc energia necesară funcţionării celulei, precum şi acele care sintetizează neurotransmiţătorii. Astfel, mitocondriile generează ATP-ul necesar întreţinerii activităţii celulare ridicate a unui neuron activ iar ribozomii şi reticulul endoplasmatic sintetizează peptide şi proteine specifice funcţiei neuronale.

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

(b) Dendritele sunt niște exvaginații ale somei (corpului neuronal) specializate în recepția semnalelor chimice, iar în SNC un neuron primește informații de la alt neuron prin intermediul contactelor (sinapselor) realizate pe dendrite. Cu toate că și alte contacte neuronale se pot stabili și pe soma, cele mai multe sinapse - ~ 90 % - au loc pe dendrite. Dendritele convertesc semnalele chimice primite de la un neuron vecin în semnale electrice, transmise ulterior pe soma neuronală.

(c) Axonul este o 'prelungire' citoplasmatică lungă, cu rol în transmisia semnalului electric (denumit potențial de acțiune) generat primar pe soma neuronală. Citoplasma axonului se numește axoplasmă, și conține neurofibrile: acestea sunt structuri proteice cu rol de suport citoplasmatic mecanic, lizozomi, mitocondrii și variate enzime. Axoplasma este înconjurată de o structură celulară membranară, denumită axolemă: în SNC, axolema poate fi expusă direct fluidului interstițial sau acoperită cu o teacă de mielină. Mielina are compoziție fosfolipidică (80 %) și proteică (20 %), și joacă un rol esențial în creșterea vitezei de propagare a potențialului de acțiune generat inițial pe somă. Demielinizarea axonilor din SNC și SNP este un proces de distrugere progresivă a tecii de mielină, și rezultatul său este pierderea controlului motor și senzitiv al organismului (e.g., scleroza în plăci, difteria).

(d) Terminațiile axonale sau terminale sinaptice sunt terminațiile multiple ale unui axon, cu rol în comunicarea cu alt neuron, prin intermediul sinapselor.

După cum am subliniat mai sus, sinapsa este locul specializat implicat în comunicarea inter-neuronală. Fiecare sinapsă reprezintă conexiunea dintre două celule: (a) celula presinaptică, care transmite mesajul la terminațiile sinaptice și (b) celula postsinaptică, care recepționează mesajul transmis. Mijlocul de comunicare inter-neuronală sinaptică îl reprezintă o clasă specială de molecule, numite neurotransmițători. În terminațiile sinaptice, neurotransmițătorii sunt organizați (împachetați) în vezicule sinaptice, iar exocitoza lor în spațiul sinaptic este generată de evenimente celulare electrice. Astfel, o depolarizare locală la nivelul terminațiilor sinaptice conduce la activarea unor proteine integrale membranare specifice, denumite canale ionice de calciu. Acest fenomen favorizează intruzia ionilor de calciu extracelular în axoplasmă. Odată ajunși în axoplasmă, ionii de calciu favorizează, prin intermediul interacțiunilor electrostatice, fuzionarea veziculelor sinaptice cu membrana presinaptică și în final eliminarea acestora în spațiul sinaptic. După o perioadă de difuzie de aproximativ 0.5 ms, moleculele de neurotransmițător eliberate în spațiul sinaptic interacționează cu o clasă specifică de proteine de pe celula postsinaptică denumite receptori sinaptici, și

aceştia provoacă depolarizarea locală a celulei postsinaptice. Această depolarizare reprezintă practic punctul 'focal' de iniţiere a unei propagări nervoase sau potenţial de acţiune în celula postsinaptică, şi implicit asigurarea continuităţii de propagare a informaţiei inter-celulare.

Sinapsa realizată între un neuron (celulă nervoasă) şi alt tip de celulă se numeşte joncţiune neuroefectoare. Există două clase mari de asemenea joncţiuni:

- joncţiunea neuromusculară, în care un neuron comunică cu o celulă musculară
- joncţiunea neuroglandulară, în care un neuron comunică cu o celulă glandulară

În capitolele anterioare am prezentat protocolul de aplicare al unor legi fizice pentru deducerea expresiei diferenţei de potenţial de repaus a unei celule, aflate în stare de echilibru sau staţionară, în ceea ce priveşte fenomenele de transport ionic transmembranare. Există însă clase specifice de celule (reprezentative pentru această categorie sunt celulele nervoase şi cele musculare – aşa cum a fost introdus mai sus) caracterizate electric şi prin posibilitatea iniţierii unei modificări controlabile a diferenţei de potenţial transmembranar, care se auto-propagă în lungul membranei celulare şi care se numeşte potenţial de acţiune celular.

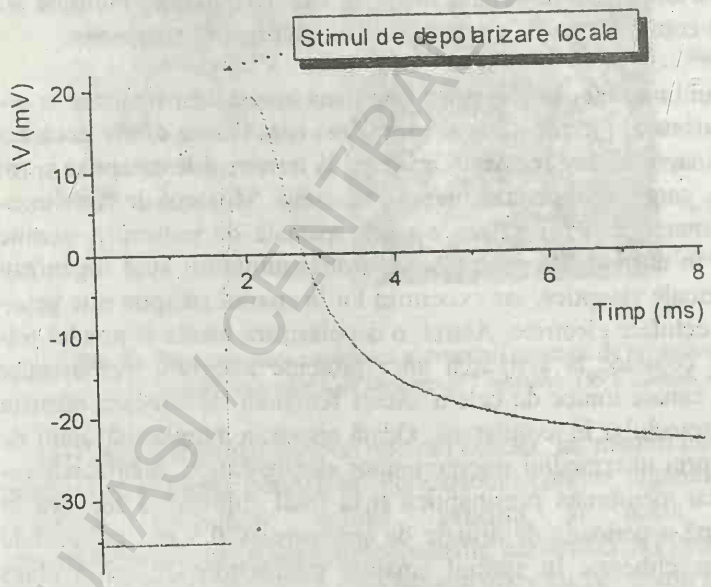


Fig. 55

Înregistrarea electrică a unui potenţial de acţiune local, propagabil, în membrana excitabilă a muşchiului striat de la *Rana temporaria (Tudor Luchian, Pavel Cătălin, Bancia Victor – rezultate nepublicate)*

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

A.L. Hodgkin şi A.F. Huxley au fost cei care în 1952 au conceput primul model integrat capabil să explice fenomenologic iniţierea şi propagarea potenţialului de acţiune în lungul celulelor excitabile; de asemenea, modelul lor a permis simularea corectă a propagării potenţialelor de acţiune celulare.

12.2. *Tehnica de măsurare a curenţilor electrici transmembranari în condiţii de voltaj fixat ('voltage-clamp')*

În încercarea lor de a explica fenomenologic iniţierea şi propagarea unui potenţial de acţiune în lungul membranei celulare excitabile, Hodgkin şi Huxley au pornit de la observaţia că apariţia unei depolarizări membranare propagabile, sau apariţia unui potenţial de acţiune, este însoţită de scăderea dramatică a impedanţei membranare şi apariţia unor fluxuri ionice transmembranare. În mod curent, experimentele de electrofiziologie de până atunci (anii 1950) se realizau prin stimularea locală a unei membrane excitabile cu o sursă de curent şi înregistrarea ulterioară a modificărilor diferenţei de potenţial transmembranar. Ideea lui Hodgkin şi Huxley a fost de a realiza experimente în care stimulul celular îl reprezintă un puls de depolarizare iar răspunsul celular măsurat era concretizat de curentul transmembranar ce apare ca rezultat al depolarizării.

Într-un asemenea tip de experiment, curentul total măsurat este dat de:

$$I_{total} = I_{ionic} + C_M \frac{dV}{dt} \qquad (12.1)$$

unde:

- I_{ionic} reprezintă componenta de curent electric ce apare drept rezultat al difuziei ionice prin membrană
- $C_M \frac{dV}{dt}$ este componenta capacitivă a curentului, ce apare drept rezultat al modificării de potential electric transmembranar (C_M fiind capacitatea echivalentă a membranei)

Această metodă, deşi oferă o posibilitate elegantă de a înregistra curenţii electrici transmembranari asociaţi cu depolarizarea locală a membranei excitabile, suferă de două deficienţe majore:

A. Prezenţa în expresia curentului electric total înregistrat a componentei capacitive duce la 'contaminarea' componentei de curent ionic (I_{ionic}), a cărei evoluţie temporală este urmărită în experiment. În cazul cel mai nefericit, curenţii

ionici cu dinamică mai rapidă şi amplitudine mai mică decât curentul capacitiv devin imposibil de separat din curentul total înregistrat, făcând experimentul inutil.

B. Curentul ionic de interes practic este o funcţie de timp şi de diferenţa de potenţial transmembranară ($I_{ionic} = I_{ionic}$ (V, t)). Datorită variaţiei continue a diferenţei de potenţial transmembranar ca urmare a depolarizării locale, vezi Fig. 53, curentul ionic înregistrat nu va putea oferi informaţii relevante stiinţific despre procesele intime ce stau la baza fenomenului de depolarizare membranară. Proprietăţile membranei şi ale structurilor membranare ce mediază apariţia curentului ionic se vor schimba continuu în funcţie de diferenţa de potenţial membranară instantanee (V(t)), şi deci simpla analiză a curentului ionic înregistrat în asemenea condiţii oferă doar informaţii calitative ale proceselor de permeabilitate ionică, ce sunt corelate cu apariţia şi întreţinerea unei depolarizări electrice locale.

Pentru a elimina aceste neajunsuri, Hodgkin şi Huxley au utilizat în experimentele lor o tehnică revoluţionară în electrofiziologie, denumită 'tehnica voltajului fixat' ('voltage-clamp technique'). Utilizând această tehnică, experimentatorul măsoară curenţii electrici transmembranari ce apar ca urmare a depolarizării membranare locale, în condiţiile în care diferenţa de potenţial transmembranar NU se modifică în timp, rămânând 'fixată' la o valoare aleasă de experimentator. În acest fel, se pot înregistra curenţii ionici ce apar în răspuns la depolarizări membranare de diferite amplitudini, şi deci proprietăţile complete ale acestor curenţi, dependenţa lor de timp şi potenţial, pot fi descifrate relativ uşor.

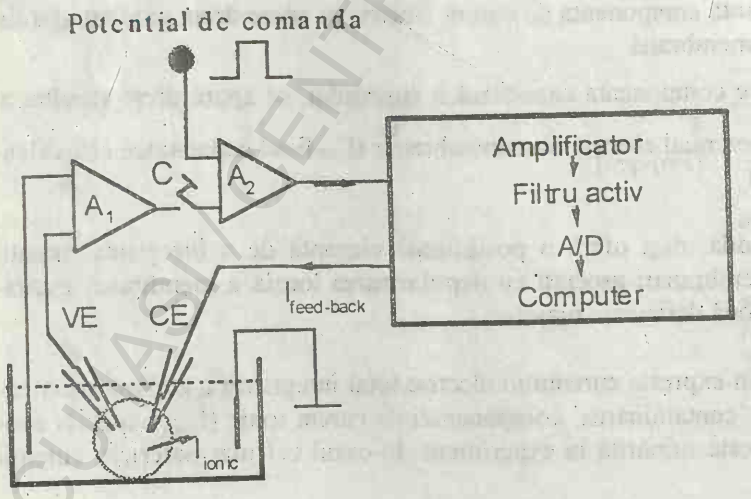


Fig. 56.

Reprezentarea electrică simplificată de menţinere a diferenţei de potenţial transmembranară fixată, prin metoda *'two-electrodes-voltage-clamp'* [*Luchian, T. 1997., Ph. D. Thesis, Graz*]

Există mai multe scheme echivalente ale unui circuit electronic de menținere a voltajului 'fixat'; în Fig. 56, este prezentată una din aceste variante.

Un circuit de măsurare a curenților transmembranari în condiții de voltaj fixat utilizează o buclă de reacție feed-back negativă ce menține diferența de potențial transmembranară constantă, indiferent de amplitudinea și modul de variație temporală a curentului ionic prin membrană.

După cum este figurat schematic în figura 56, atunci când comutatorul (C) este în poziția 'deschis', elementul de circuit A_1 măsoară diferența de potențial între mediul intern și extern al celulei de studiu, cu ajutorul electrodului VE. Dacă acest comutator este închis, prin intermediul elementului de circuit A_2 putem controla direct valoarea diferenței de potențial transmembranară (vezi proprietățile circuitelor integrate operaționale: diferența de potențial între intrările inversoare și neinversoare ale unui astfel de circuit - A_2 - este nulă). Astfel, pentru a excita local celula de studiat, este suficient ca experimentatorul să modifice controlabil valoarea potențialului $V_{comanda}$. În cazul în care $V_{comanda}$ este astfel ales încât să depolarizeze celula, prin membrana celulară se va stabili curentul ionic ($I_{ionic} = I_{ionic}$ (V, t)), ale cărui proprietăți urmează a fi descrise. Pentru exemplificare, am presupus în figura 56 că acest curent ionic circulă din interiorul spre exteriorul celulei. Din considerente fizice elementare, trecerea unui curent ionic prin membrana celulară ar avea drept rezultat modificarea diferenței de potențial transmembranară, așa cum se întâmplă în cazul în care potențialul este 'ne-fixat'. Consecința firească a acestei modificări de potențial transmembranar ar fi că, în ceea ce privește elementul de circuit A_2, diferența de potențial între intrările sale ar deveni diferită de zero. Prin construcție însă, circuitele integrate operaționale își modifică proprietățile la ieșire astfel încât, printr-o buclă de feed-back, păstrează **neschimbată** diferența de potențial între cele două intrări și egală cu zero. Cu alte cuvinte, elementul de circuit A_2 va **injecta** în celulă un curent electric, prin intermediul electrodului CE, cu o asemenea cinetică încât să **compenseze exact** curentul ionic care iese din celulă ($I_{feed-back}$), și deci diferența de potențial între mediul intra- și extracelular să rămână neschimbată ($V_{comanda}$). Un asemenea circuit măsoară indirect curentul electric ionic ce se stabilește prin membrana celulară ca urmare a excitarii sale electrice.

Cu toate avantajele de utilizare ale acestei tehnici pentru măsurarea curenților relativ mari prin celule, există două inconveniente majore inerente, de care orice biofizician trebuie să fie conștient, pentru a le minimiza efectele în măsuratori de electrofiziologie celulară:

1. Schema electrică echivalentă, construită cu elemente de circuit active și pasive, a circuitului prezentat în Fig. 54 este următoarea:

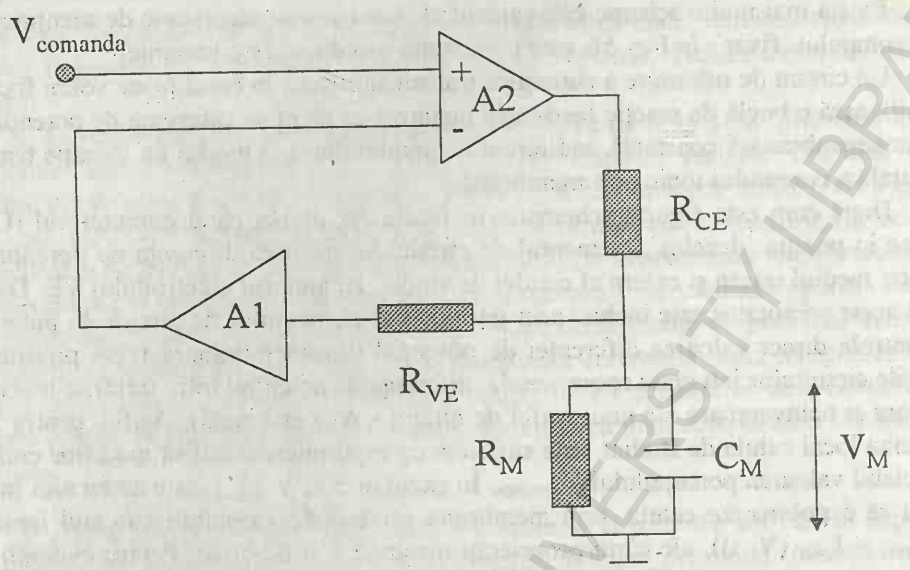


Fig. 57. Reprezentarea electrică cu elemente de circuit active şi pasive a dispozitivului utilizat pentru menţinerea fixată a diferenţei de potenţial transmembranar, cu tehnica *`two-electrodes-voltage-clamp`*.

În acest caz, în urma unei analize de circuit, se poate arăta că dacă potenţialul de membrană se stabileşte la valoarea ($V_{comanda}$), cu scopul de a modifica astfel potenţialul de membrană la aceeaşi valoare ca şi $V_{comanda}$, pentru a crea condiţii particulare de măsurare a curenţilor electrici prin biomembrană în urma acestei modificări de diferenţă de potenţial transmembranar, (asa cum a fost arătat mai sus), căderea de potenţial *reală* pe biomembrană (V_M) este dată de relaţia:

$$\frac{V_M}{V_{comanda}} = \frac{\mu K}{\mu K + 1} = \alpha \qquad (12.2)$$

unde:

- $K = \frac{R_M}{R_M + R_{CE}}$
- μ este factorul de amplificare al amplificatorului A2
- R_M, R_{CE}, R_{VE} sunt rezistenţele biomembranei, electrodului CE şi VE iar C_M este valoarea capacităţii biomembranei

Se observă că într-un asemenea circuit, în timpul măsuratorilor, biomembrana va fi supusă unei diferenţe de potenţial care va fi diferită de cea impusă din

circuitul operațional A2. Pentru a minimiza această eroare, trebuie ca factorul de amplificare al amplificatorului A2 să fie cât mai mare, condiții în care $\alpha \sim 1$

2. Datorită prezenței elementului de capacitate electrică introdus de biomembrană (C_M), în urma unei modificari tip 'treaptă' a potențialului de comandă, potențialul de membrană se va modifica spre valoarea finală dată de $V_M = V_{comanda} * \alpha$ cu o anumită evoluție temporală, diferită de cea 'treaptă', și anume:

$$V_M(t) = \alpha V_{comanda}\left[1 - e^{-\frac{t}{\tau_0}}\right] \qquad (12.3)$$

unde:

- $\tau_0 = \dfrac{R_M R_{CE} C_M}{(\mu+1)R_M + R_{CE}}$

În aceste condiții, curentul electric măsurat prin circuit în cursul modificării diferenței de potențial transmembranar și care este dezvoltat *independent* de curenții ionici de interes este dat de:

$$I_M(t) = \frac{\alpha V_{comanda}}{R_M}\left[1 + \frac{\tau_M - \tau_0}{\tau_0} e^{-\frac{t}{\tau_0}}\right] \qquad (12.4)$$

unde:

- τ_0 este definit ca mai sus
- $\tau_M = C_M R_M$

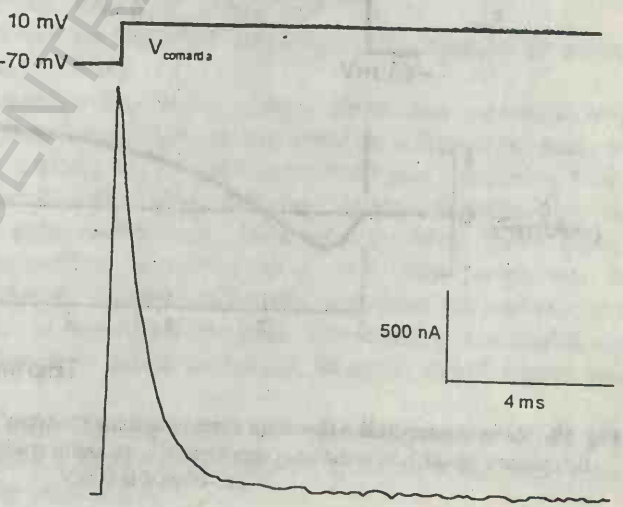


Fig. 58.

Variația în timp a curentului electric rezidual, ce apare într-un circuit tip *'two-electrodes-voltage-clamp'*, la modificarea în treaptă a diferenței de potențial fixată de la –70 la 10 mV (*Tudor Luchian, rezultate nepublicate*)

BCU / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Prezența acestui curent membranar 'rezidual', datorat doar prezenței elementelor de circuit electronic din amplificatorul utilizat și a proprietăților electrice pasive biomembranare, poate perturba iremediabil studierea curentului ionic transmembranar. Astfel, dacă într-un experiment (sugerat și de Fig. 58) variația temporală a curentului 'rezidual' este mult mai lentă decât cea a curentului ionic mediat de canalele ionice celulare, curentul 'rezidual' va estompa cvasi-complet curentul ionic de interes. În lipsa aplicării unor tehnici numerice sau utilizării unor echipamente electronice performante adecvate, ce pot elimina în mare parte curentul 'rezidual', devine imposibilă analiza componentei de curent electric 'utilă' (ionică) prin celula studiată.

12.3. *Conducția potențialului de acțiune în membrana celulară excitabilă. Modelul Hodgkin-Huxley*

În încercarea lor de a înțelege și apoi descrie mecanismele ce stau la baza inițierii și propagării potențialelor de acțiune în lungul membranelor excitabile, Hodgkin și Huxley au realizat experimente de măsurare a curenților transmembranari prin membrana axonilor de calmar (squid), ce apar ca urmare a excitării electrice (depolarizării) axonale.

În urma unor astfel de experimente (utilizând tehnica 'voltage-clamp' descrisă în capitolul anterior), ei au obținut următoarea variație a curenților transmembranari:

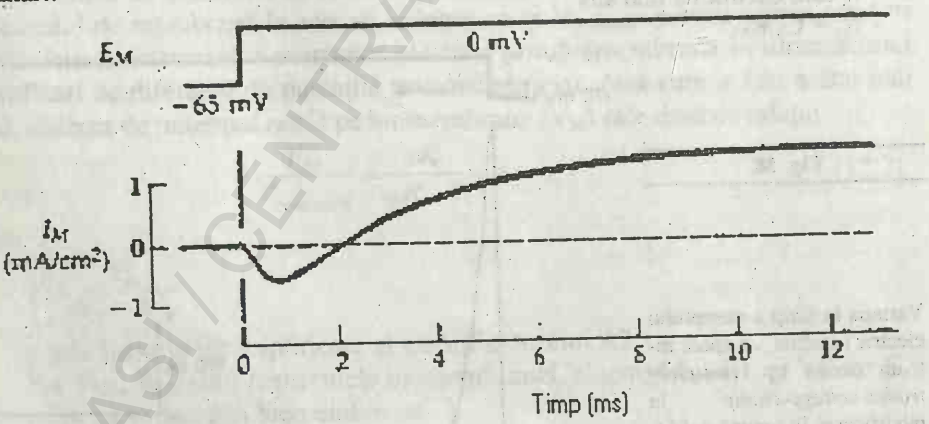


Fig. 59. Variația temporală a densității curentului ionic (mA/cm^2) ce apare în membrana axonului de calmar ('*squid*'), în urma unei depolarizări a axonului studiat de la un potențial de repaus de –65 mV la 0 mV

Convenția utilizată de ei privind interpretarea semnului curentului transmembranar obținut în astfel de măsurători a fost că acei curenți electrici care se datorează difuziei sarcinilor ionice din mediul intracelular în cel extracelular (curenți tip 'outward') sunt considerați pozitivi, iar cei 'inward', care difuzează din mediul extracelular în citosol, sunt considerați în reprezentările grafice cu semnul minus.

Numeroase date experimentale au arătat că o hiperpolarizare de tip 'step' (schimbare de diferență de potențial tip 'treaptă') a membranei excitabile de la diferența de potențial de repaus (~ -65 mV) la –130 mV conduce la apariția unui curent tip 'inward', cu amplitudine foarte mică (densitate de curent de ~ 30 $\mu A/cm^2$). Dacă în schimb membrana axonală este depolarizată până la 0 mV, utilizând un protocol de modificare a diferenței de potențial identic cu cel de mai sus – semnal tip 'step' (Fig. 59), curentul transmembranar înregistrat are proprietăți diferite: se observă în primele ~ 2 ms de la depolarizare un curent tip 'inward' (densitate de curent maximă ~ -0.5 mA/cm^2) urmat de o schimbare a sensului curentului (care devine 'outward') și o modificare substanțială a densității maxime de curent (> 1 mA/cm^2). Astfel, tehnica 'voltage-clamp' a oferit pentru prima oară posibilitatea urmăririi și înregistrării curenților electrici transmembranari ce însoțesc excitarea electrică locală a unei membrane excitabile.

Următorul pas al lui Hodgkin și Huxley a fost de a izola și identifica componentele individuale ale curenților ionici ce formează curentul ionic total înregistrat în urma depolarizării locale membranare. Astfel, utilizând tehnici farmacologice și electrofiziologice specifice, ei au concluzionat că există două componente esențiale ale curentului ionic măsurat: curentul datorat difuziei ionilor de sodiu (I_{Na}) și cel datorat difuziei ionilor de potasiu (I_K).

În Fig. 60 este ilustrată metoda clasică de identificare a curentului de sodiu, utilizând tehnica de substituție ionică.

Într-un asemenea experiment, curentul total prin membrana excitabilă este generat prin depolarizarea membranei de la un potențial de referință (repaus) de –65 mV la –9 mV; I_{Na} este separat din curentul ionic total prin substituția NaCl din soluția externă cu clorură de colină (spre deosebire de ionii de sodiu, ionii de colină sunt impermeanți prin membrană). Diferența algebrică între datele reprezentând evoluția temporală a curentului ionic total prin membrană, în prezența NaCl în soluția externă, și când NaCl a fost substituit (ca mai sus) are ca rezultat un set de date ce reprezintă evoluția temporală a curentului tip 'inward' de sodiu ce difuzează în celula excitabilă, în urma depolarizării sale locale.

Evaluări experimentale ulterioare au stabilit că acea componentă ionică din curentul total ce se înregistrează în urma subsituției ionilor de sodiu reprezintă curentul ionic de potasiu (tip 'outward').

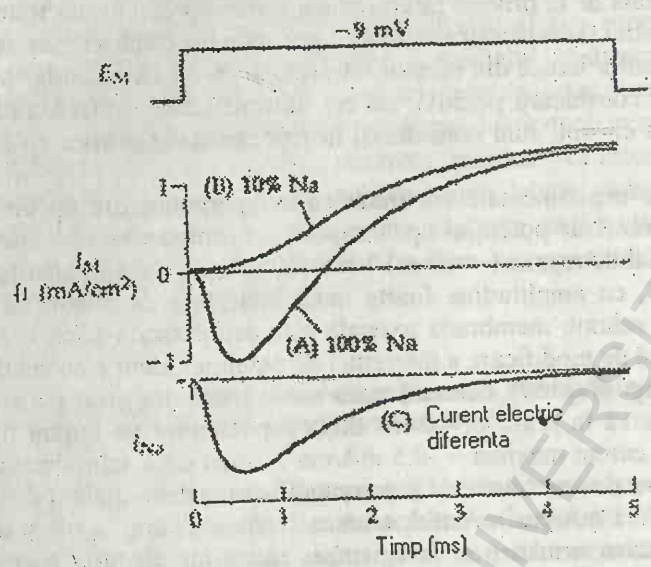


Fig. 60. Ilustrarea metodei utilizate de Hodgkin şi Huxley pentru identificarea curentului de sodiu folosind tehnica de substituţie ionică. Prin operaţia de scădere din curentul ionic total înregistrat în prezenţa sodiului (*100 % Na*) pe cel ce se observă în cvasi-absenţa acestui ion (*10 % Na*), se obţine curentul ionic datorat doar difuziei ionilor de sodiu prin biomembrana studiată.

Una din diagramele cel mai des utilizate pentru caracterizarea primară, din punct de vedere electric, a proprietăţilor curenţilor ionici prin membranele excitabile, este reprezentarea grafică I-V (caracteristica de curent-tensiune a curentului electric ionic). Aşa după cum am arătat şi mai sus, curentul ionic înregistrat în urma depolarizării membranei celulare excitabile are o anumită dependenţă temporală, chiar şi în condiţiile în care diferenţa de potenţial aplicată membranei este constantă: în urma unei depolarizari de la –65 mV la –9 mV, ce iniţiază stabilirea curentului ionic prin membrană , diferenţa de potenţial finală rămâne constantă (`fixată`) la –9 mV, pe toată durata desfăşurării experimentului. Pentru construirea diagramelor I-V se utilizează valorile maxime ale curentului ionic (componentei curentului ionic de studiat) $I_{max.}$ din dependenţa sa temporală, aşa cum sunt măsurate la o anumită valoare a tensiunii de depolarizare (V).

Figura de mai jos ilustrază diagramele I-V pentru componentele ionice de sodiu şi potasiu ale curentului ionic total, iniţiate prin depolarizarea la diferite valori ale diferenţei de potenţial transmembranară a axonului de calmar.

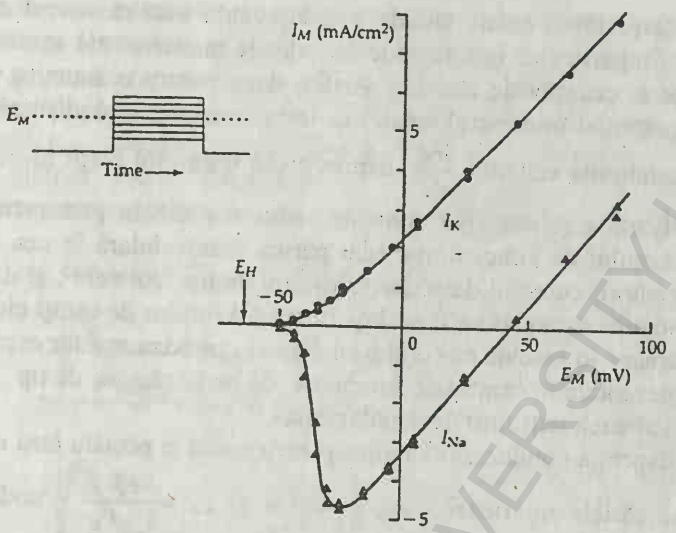


Fig. 61. Diagramele I-V pentru curenții ionici de sodiu (I_{Na}) și potasiu (I_K) ce traversează membrana axonului de calmar, măsuați în experimente de tip 'voltage-clamp' [*Ionic Channels of Excitable Membranes, 1992, Hille B.*]

Analizând această diagramă, se pot remarca două aspecte importante ce sunt corelate cu procesele de difuzie ionică transmembranară:

1. Ionii de potasiu difuzează din mediul intracelular în cel extracelular, pentru orice valoare a potențialului de depolarizare membranară (I_K rămâne de tip 'outward'); deci, I_K are doar valori pozitive (vezi convenția lui Hodgkin și Huxley descrisă mai sus).

2. Curentul de sodiu (I_{Na}) este 'inward' într-un anumit domeniu de tensiuni de depolarizare, iar după atingerea unei valori de 'peak' (valoare maximală) își modifică amplitudinea, devenind chiar de tip 'outward' după ce tensiunea de depolarizare depășește 48 mV

Pentru a explica această proprietate a curentului de sodiu, vom face referire la ecuația lui Kramer modificată (vezi capitolele anterioare), ce descrie difuzia ionilor pozitivi prin membrana celulară în prezența unui gradient de concentrație ionică și a unei diferențe de potențial transmembranară.

$$J^+ = -D^+ \frac{dC^+}{dx} - z^+ q_e B^+ C^+ \frac{d\Psi}{dx} \qquad (12.5)$$

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Una din interpretările colaterale ale acestei ecuații este că **sensul** curentului ionic măsurat (în particular I_{Na}) depinde de valorile numerice ale cantităților din membrul drept al ecuației de mai sus. Astfel, dacă pentru o anumită valoare a diferenței de potențial transmembranare, ce intra în expresia gradientului de potențial prin membrana celulară $\frac{d\Psi}{dx}$, expresia din membrul drept al ecuației lui Kramer modificată este negativă, ionii de sodiu vor difuza prin membrană în 'sensul' gradientului de concentrație (din partea extracelulară în cea intercelulară). În caz contrar, curentul de sodiu va deveni de tip 'outward', şi deci sensul de difuzie al ionilor de sodiu va fi acelaşi cu sensul liniilor de câmp electric prin membrană (rămâne în sarcina cititorului să explice, pe baza acestor explicații şi a elementelor prezentate în capitolele anterioare, de ce I_K rămâne de tip 'outward', indiferent de valoarea tensiunii de depolarizare).

Utilizând expresia conductanței ionice pentru sodiu şi potasiu (asa cum le-am definit şi în capitolele anterioare - $g_{Na} = \frac{I_{Na}}{V - V_{Na}}$ şi $g_K = \frac{I_K}{V - V_K}$ - unde semnificația termenilor a fost deja explicată), şi folosind datele experimentale referitoare la variația temporală a curenților de sodiu şi respectiv potasiu în urma unei depolarizări membranare (vezi Fig. 58 pentru cazul curentului ionic de sodiu), Hodgkin şi Huxley au dedus expresiile variațiilor temporale ale conductanței sodiului şi potasiului în urma unei depolarizări locale.

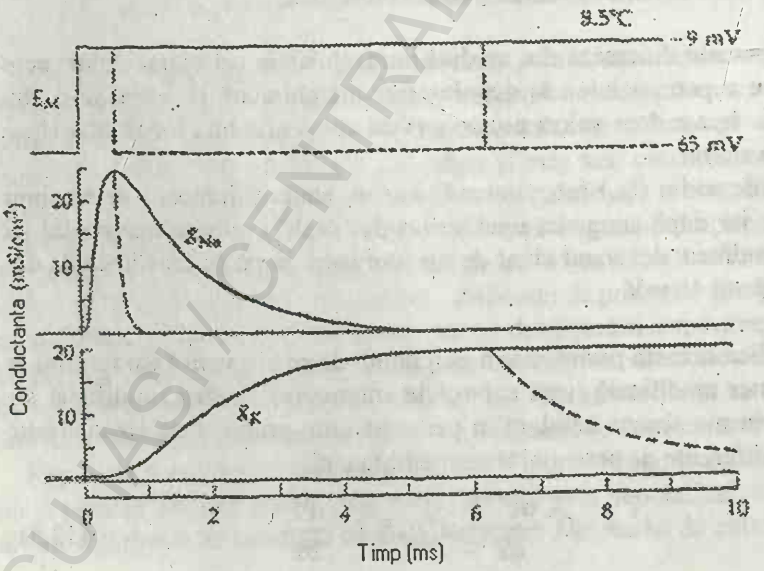


Fig. 62.

Variația temporală a conductanțelor pentru ionii de sodiu (g_{Na}) şi potasiu (g_K) în cursul procesului de permeație prin membrana de calmar, așa cum apare în urma unei depolarizări tip 'voltage-clamp' de la un potențial de repaus membranar de –65 mV la –9 mV [după *Ionic Channels of Excitable Membranes, 1992. Hille, B.*]

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Ca şi în cazul curenţilor de sodiu şi potasiu, dependenţa g_{Na} şi g_K se exprimă şi in termeni temporali, şi de tensiune. În urma unei depolarizări tip treaptă (`step`), g_{Na} creşte repede la o valoare maximală (`peak`) şi apoi descreşte la o valoare apropiată de zero (se inactivează); g_K se activează de aproape 10 ori mai încet decât g_{Na}, atingând o valoare maximală în aproximativ 10 ms fără a se inactiva ulterior. Aceste proprietăţi cinetice ale curenţilor de sodiu şi potasiu sunt şi dependenţe de tensiune, aşa cum este evidenţiat mai jos (Fig. 63).

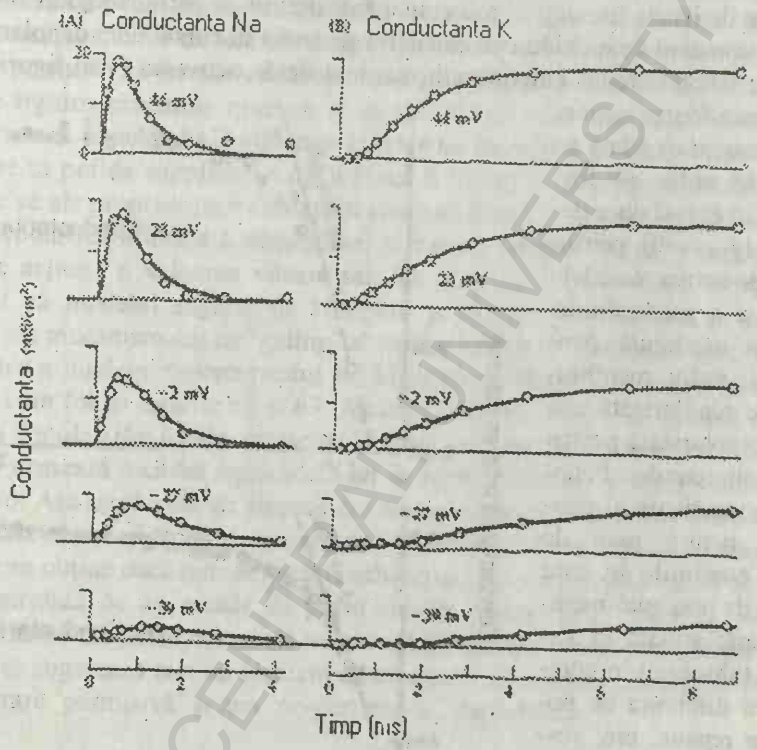


Fig. 63. Dependenţa de diferenţa de potenţial de depolarizare a variaţiilor temporale ale conductanţelor ionice de sodiu (A) şi potasiu (B), aşa cum apar în urma experimentelor tip `voltage-clamp` pe neuronii de calmar

Aşa după cum este evidenţiat de figurile 62 şi 63, în urma unei depolarizări tip `treaptă` a membranei excitabile, conductanţa pentru ionii de sodiu (g_{Na}) creşte (se activează) şi apoi se inactivează. Putem deci afirma că există două procese cinetice care controlează variaţia în timp a conductanţei pentru ionii de

sodiu. În termenii analizei acestor procese efectuate de către Hodgkin şi Huxley, fenomenul de activare al g_{Na} este un proces foarte rapid care deschide canalele de sodiu în timpul depolarizării membranare. Faptul că procesul de activare al g_{Na} este şi voltaj-dependent (Fig. 63) este mai bine prezentat în figura următoare (Fig. 64), care ilustrează dependenţa de potenţialul de depolarizare a maximului conductanţei pentru ionii de sodiu şi potasiu, în cazul membranei excitabile a neuronului de calmar.

Procesul de inactivare al g_{Na}, aşa cum a fost definit de către Hodgkin şi Huxley, este fenomenul de închidere al canalelor de sodiu în cursul unei depolarizări. Inactivarea este un proces cinetic mult mai lent decât activarea (vezi figurile 62 şi 63), şi este foarte important de remarcat că odată ce canalele de sodiu au fost inactivate în cursul unei depolarizări ($g_{Na} \rightarrow 0$), pentru a putea de-activa canalele de sodiu şi a permeabiliza membrana excitabilă pentru ionii de sodiu, membrana trebuie repolarizată sau chiar hiperpolarizată pentru câteva milisecunde. Fenomenul de inactivare al conductanţei pentru ionii de sodiu în condiţiile în care diferenţa de potenţial membranară este situată la valori mici (absolute) în comparaţie cu diferenţa de potenţial de repaus, este responsabil pentru pierderea excitabilităţii şi în final moartea celulelor excitabile într-o varietate de condiţii experimentale şi clinice, cum ar fi: când concentraţia ionilor de potasiu este mărită în mediul extracelular, anoxie prelungită a

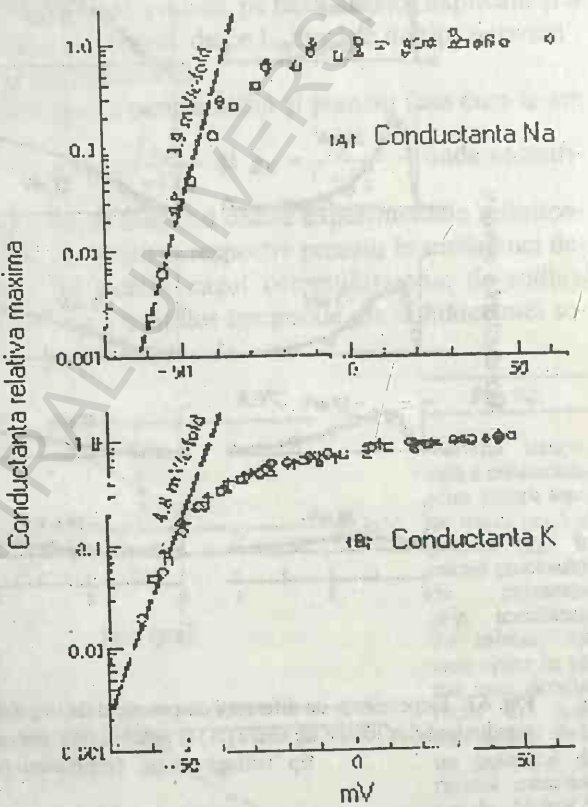


Fig. 64. Dependenţa de diferenţa de potenţial de depolarizare a conductanţelor maxime pentru ionii de sodiu (A) şi potasiu (B) ce permează axonii de calmar, aşa cum au fost deduse în urma experimentelor tip *'voltage-clamp'* [*Ionic Channels of Excitable Membranes, 1992. Hille, B.*]

celulei sau blocaj metabolic. (Utilizând informațiile prezentate și în capitolele anterioare, explicați mecanismul influenței acestor procese asupra diferenței de potențial transmembranar).

Scopul definit al lui Hodgkin și Huxley era să explice în termeni moleculari mecanismele cinetice ale activării și inactivării membranei excitabile de squid pentru difuzia ionilor de sodiu și potasiu, precum și elucidarea mecanismului propagării potențialului de acțiune în membranele celulelor excitabile. După testarea intensivă a mai multor mecanisme capabile să răspundă la întrebările menționate mai sus, ei au trebuit să accepte concluzia că experimentele efectuate nu puteau promova și dovedi existența unui mecanism molecular unic, capabil să descrie riguros procesele cinetice și de difuzie ce caracterizează excitabilitatea membranară. În schimb, Hodgkin și Huxley au dezvoltat un model cinetic **empiric**, care în pofida simplității sale, a putut fi folosit în efectuarea de determinări cantitative ale proprietaților curenților electrici locali transmembranari ce apar în urma depolarizării locale a membranei și a putut **prezice** corect forma potențialelor de acțiune și valoarea vitezei sale de propagare. Este foarte important de precizat că modelul sugerat de Hodgkin și Huxley evidențiază și trăsăturile majore ale mecanismului de `gating` al curenților ionici transmembranari.

Pentru a înțelege raționamentul lui Hodgkin și Huxley în elaborarea acestui model, vom folosi figurile 62 și 63. Analizând aceste figuri, se observă că în urma unei depolarizări locale, creșterea în timp a conductanței pentru ionii de potasiu (g_K) urmează o curbă sigmoidală iar la repolarizare g_K descrește exponențial spre zero. Așa după cum au sugerat cei doi cercetători, și în urma unor încercări numeroase ale altor modele, mecanismul molecular al unei astfel de manifestări cinetice se obține dacă admitem că deschiderea (activarea) unui canal de potasiu este controlată de un număr de patru entități moleculare, intermembranare și independente. Să presupunem de asemenea că fiecare din aceste entități, despre care nu se sugerează nici un element de structură, realizează tranziții de ordinul I între o stare `permisivă` și una `ne-permisivă`, după reacția:

$$(1-n)_{ne-permisiv} \underset{\beta_n}{\overset{\alpha_n}{\Leftrightarrow}} (n)_{permisiv} \qquad (12.6)$$

În reacția scrisă mai sus, (n) este probabilitatea ca o asemenea entitate moleculară să se afle în starea `permisivă`. Starea `permisivă` este asimilată în modelul lui Hodgkin și Huxley cu dispunerea membranară corectă a unei asemenea entități, astfel încât activarea (deschiderea) canalului de potasiu să devină posibilă. Pentru a fi în bună concordanță cu datele experimentale (vezi Fig. 62 și Fig. 63), Hodgkin și Huxley au sugerat că este nevoie ca toate cele patru entități moleculare să fie simultan în starea `permisivă` pentru ca un canal de potasiu să

devină activat (deschis). Figura 65 arată într-adevăr că, dacă probabilitatea ca o singură entitate să fie în starea 'permisivă' variază în timp exponenţial, variaţia în timp a probabilităţii ca un număr minim de patru asemenea entităţi independente să fie în stare 'permisivă' (n^4) (în urma unei depolarizări tip 'step') urmează forma unei funcţii sigmoidale; în urma repolarizării, n^4 variază exponenţial spre zero, aşa după cum este sugerat şi de datele experimentale (Fig. 62 şi 63).

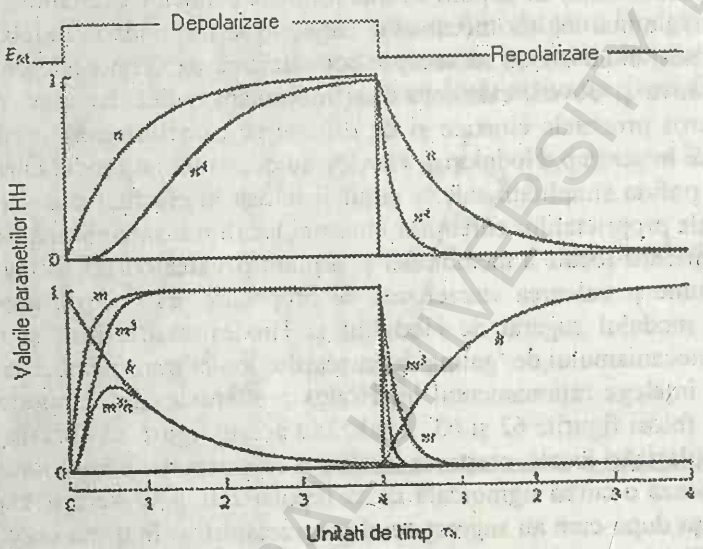


Fig. 65. Dependenţa temporală a parametrilor n^4 şi m^3h din modelul lui Hodgkin şi Huxley, în cursul unei depolarizări şi apoi repolarizări membranare, care încearcă să modeleze procesele cinetice ce descriu variaţia conductanţelor de sodiu şi potasiu prin membrana excitabilă de calmar

Variaţia în timp a probabilităţii ca o singură entitate să fie în starea 'permisivă' este dată de soluţia ecuaţiei diferenţiale:

$$\frac{dn}{dt} = \alpha_n(1-n) - \beta_n n \qquad (12.7)$$

Deoarece experimentele au arătat că procesul de deschidere (activare) al canalelor de potasiu este şi voltaj-dependent (vezi Fig. 63 şi Fig. 64), s-a admis că acele patru entităţi intermembranare moleculare posedă sarcină netă diferită de zero. În acest fel şi cinetica lor, adică ratele de tranziţie spre starea 'permisivă' (α_n) şi 'ne-permisivă' (β_n), este de asemenea voltaj-dependentă.

Utilizând notațiile:

$$\tau_n = \frac{1}{\alpha_n + \beta_n}$$
$$n_\infty = \frac{\alpha_n}{\alpha_n + \beta_n} \qquad (12.8)$$

ecuația diferențială de mai sus se poate scrie sub forma:

$$\frac{dn}{dt} = \frac{n_\infty - n}{\tau_n} \qquad (12.9)$$

şi are soluția:

$$n(t) = n_\infty - (n_\infty - n_0)e^{\left(-\frac{t}{\tau_n}\right)} \qquad (12.10)$$

unde semnificația parametrilor este așa cum a fost descrisă mai sus. iar n_0 este valoarea lui n la t=0.

Hodgkin şi Huxley au utilizat un formalism similar pentru a descrie proprietățile curentului ionic de sodiu (I_{Na}). cu patru entitați moleculare independente şi fiecare din aceste entități tranziționează între o stare `permisivă` şi una `nepermisivă` (așa cum a fost descris mai sus). Având însă în vedere că spre deosebire de curentul ionic de potasiu. în cazul curentului de sodiu există două procese distincte ce-i controlează cinetica. un proces de activare şi unul de inactivare. avem de-a face cu două tipuri distincte de asemenea entități: trei entități controlează independent procesul de activare (probabilitatea ca o asemenea particulă să fie în starea `permisivă` a fost notată cu `m`). şi una procesul de inactivare (probabilitatea ca o asemenea particulă să fie în starea `permisivă` a fost notată cu `h`. şi exprimă probabilitatea ca un canal de sodiu să nu fie inactivat).

Probabilitatea ca toate cele patru particule să se afle simultan în starea permisivă. şi deci canalul de sodiu devine activat. este dată de m^3h.

Reacțiile unimoleculare pentru cele două tipuri distincte de particule activatoare şi inactivatoare sunt:

$$1 - m \underset{\beta_m}{\overset{\alpha_m}{\Leftrightarrow}} m$$
$$1 - h \underset{\beta_h}{\overset{\alpha_h}{\Leftrightarrow}} h \qquad (12.11)$$

iar ecuațiile diferențiale ce descriu evoluția temporală a soluției acestor reacții sunt:

BCU IASI UNIVERSITY LIBRARY

$$\frac{dm}{dt} = \alpha_m(1-m) - \beta_m m = \frac{m_\infty - m}{\tau_m}$$
$$\frac{dh}{dt} = \alpha_h(1-h) - \beta_h h = \frac{h_\infty - h}{\tau_h} \qquad (12.12)$$

unde:

$$\tau_m = \frac{1}{\alpha_m + \beta_m}$$
$$\tau_h = \frac{1}{\alpha_h + \beta_h}$$
$$m_\infty = \frac{\alpha_m}{\alpha_m + \beta_m} \qquad (12.13)$$
$$h_\infty = \frac{\alpha_h}{\alpha_h + \beta_h}$$

Forma soluției fiecărei ecuații diferențiale este identică cu cea scrisă pentru cazul entităților ce controlează cinetic dependența temporală a curentului de potasiu, iar ratele de tranziție α_m, β_m, α_h, β_h sunt voltaj-dependente.

Utilizând acest formalism, modelul Hodgkin şi Huxley descrie curentul ionic ce se stabileşte prin membrana axonului de calmar în urma unei depolarizări locale astfel:

$$I_{ionic}(t) = m^3(t)h(t)\overline{g_{Na}}(V - V_{Na}) + n^4(t)\overline{g_K}(V - V_K) + \overline{g_L}(V - V_L) \qquad (12.14)$$

unde:

- $\overline{g_{Na}}$, $\overline{g_K}$ şi $\overline{g_L}$ sunt conductanțele maxime pentru curenții de sodiu, potasiu şi cel nespecific (`leakage`)
- m(t), n(t), h(t) au semnificația descrisă mai sus
- V_{Na}, V_K şi V_L sunt potențialele Nernst pentru ionii de sodiu, potasiu şi cei care difuzează prin membrană neselectiv (curenți de scurgere – `leakage`)

În modelul descris de Hodgkin şi Huxley, toate proprietățile de excitabilitate electrică ale membranei biologice studiate sunt conținute în dependența temporală şi de diferența de potențial a coeficienților h, m şi n. Astfel, în urma unei depolarizări locale, coeficienții h, m şi n variază după o anumită lege temporală (vezi ecuațiile de mai sus), care este de asemenea dependentă de valoarea absolută a depolarizării membranei.

Aşa după cum subliniam la începutul acestui capitol, una din principalele calități ale acestui model este utilitatea sa în a prezice corect forma variației temporale a diferenței de potențial transmembranar în urma unei excitări electrice, precum şi modul de propagare al potențialului de acțiune.

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Pentru a vizualiza predicția teoretică a formei dependenței de timp pentru diferența de potențial transmembranar în urma unei depolarizari locale utilizând modelul Hodgkin și Huxley, se folosește ecuația:

$$I_{total} = I_{ionic} + C_M \frac{dV}{dt} \qquad (12.15)$$

(unde semnificația termenilor este așa cum a fost descrisă mai sus).

Este evident însă că posibilitatea de a calcula valoarea diferenței de potențial transmembranar (E) în orice moment (t), utilizând relația de mai sus, depinde crucial de cunoașterea precisă a modului în care curentul ionic variază în timp (dat de soluțiile ecuațiilor diferențiale ale lui n(t), m(t) și h(t)) și în funcție de diferența de potențial transmembranar (dat de dependența de potențial a parametrilor n_∞, m_∞, h_∞, τ_n, τ_m și τ_h). În acest scop, Hodgkin și Huxley au realizat o bază de date experimentale care să conțină informații despre dependența de potențial a parametrilor n_∞, m_∞, h_∞, τ_n, τ_m și τ_h și care a fost dedusă prin analiza dependenței temporale a curenților de sodiu și potasiu înregistrați în condiții de potențial fixat ("voltage-clamp"), la diferite valori ale potențialului de depolarizare.

Fără a intra în detalii experimentale, va fi prezentată în continuare sinteza acestei baze de date:

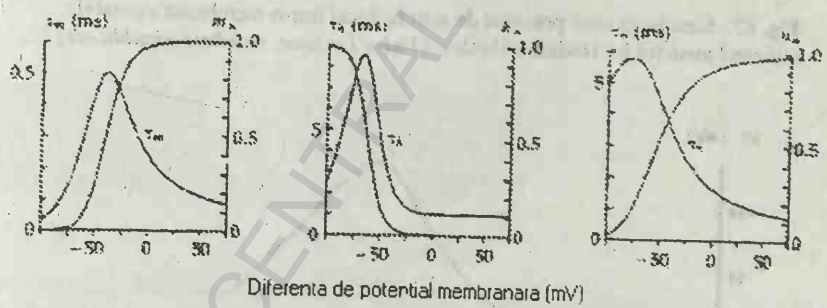


Fig. 66. Dependența experimentală a parametrilor n_∞, m_∞, h_∞, τ_n, τ_m și τ_h din modelul lui Hodgkin și Huxley de diferența de potențial de depolarizare

Pentru a simula propagarea unei depolarizări electrice locale, adică a unui potențial de acțiune, Hodgkin și Huxley au adăugat formalismului lor ecuația cablului, care este folosită pentru a descrie distribuția de curent și potențial în celule excitabile reprezentate prin elemente electrice pasive. Formalismul matematic

ce se utilizează pentru a modela evoluția temporală a unui potențial de acțiune într-un punct dat de pe o membrană excitabilă este o particularizare a ecuației generale a cablului (vezi mai jos).

Utilizând informațiile conținute în Fig. 66 cu privire la dependența de potențial a parametrilor ce intră în modelul Hodgkin-Huxley, este reprezentată mai jos simularea variației locale a diferenței de potențial transmembranar într-o membrană excitabilă, care a fost excitată inițial cu un puls de curent adecvat, ce a determinat activarea canalelor de sodiu voltaj-dependente membranare.

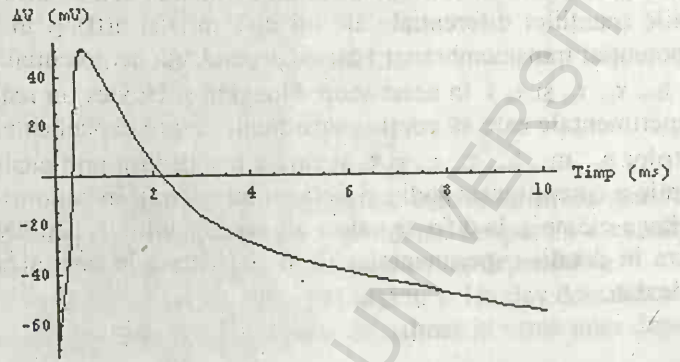


Fig. 67. Simularea unui potențial de acțiune local într-o membrană excitabilă, utilizând modelul lui Hodgkin-Huxley (*Tudor Luchian, rezultate nepublicate*)

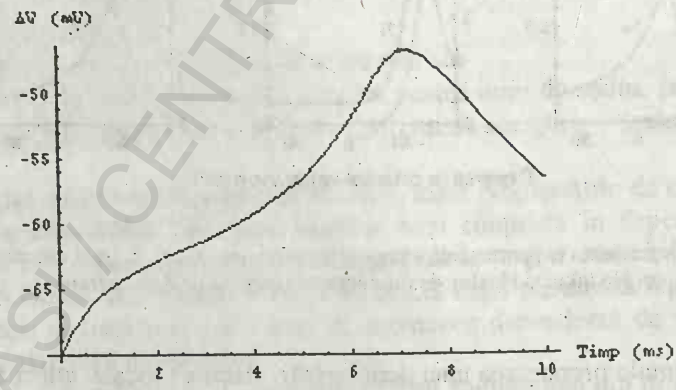


Fig. 68. Simularea variației temporale a diferenței de potențial transmembranar într-o celulă excitabilă care nu a fost depolarizată suficient de mult pentru a obține un potențial de acțiune propagabil (*Tudor Luchian, rezultate nepublicate*)

BCUIAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Dacă intensitatea curentului electric de stimulare nu este suficient de mare pentru a permite activarea canalelor de sodiu voltaj-dependente membranare, o excitare membranară locală nu produce inițierea unui potențial de acțiune propagabil.

Pentru comparația calitativă între rezultatele simulării ecuației cablului de mai sus și procesele ce au loc în celulele excitabile, se poate observa în Fig. 55 înregistrarea experimentală a variației temporale a diferenței de potențial transmembranar într-o membrană celulară excitabilă (mușchi striat de broască *Rana temporaria*), care a fost inițiată prin aplicarea unui puls de curent electric de depolarizare pe nervul sciatic aferent.

Trebuie amintit că pentru a obține o corelație mai bună între simularea unui potențial de acțiune și rezultatele experimentale ce corespund înregistrării unui potențial de acțiune local într-o membrană excitabilă, este esențial ca în ecuațiile formalismului Hodgkin-Huxley, valorile tuturor parametrilor ce descriu evoluția cinetică a curenților de sodiu și potasiu să fie corect asimilate cu date experimentale obținute pentru membrana excitabilă studiată.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

13. Propagarea perturbațiilor electrice în membranele biologice. Teoria cablului

În biofizică, teoria cablului este un formalism matematic aplicat unui sistem fizic format din elemente pasive de circuit (rezistori, capacitori), care încearcă să modeleze proprietățile electrice ale unei membrane excitabile (nerv, mușchi, neuron, etc.).

În cadrul acestei teorii, un axon este reprezentat simplificat ca un tub, cu rezistența electrică internă pe unitate de lungime r_i (Ωcm^{-1}), având capacitatea electrică a membranei pe unitate de arie C_m (Fcm^{-2}), rezistența electrică a unității de arie membranară R_m (Ωcm^2) și care este imersat într-o soluție extracelulară cu rezistența electrică externă pe unitate de lungime r_e (Ωcm^{-1}).

Valoarea curentului electric în interiorul axonului, în funcție de diferența de potențial internă, măsurată pe elementul său de lungime este (semnificația termenilor este așa cum a fost prezentată mai sus):

$$I_i r_i dx = V_{i(1)} - V_{i(2)}$$

$$I_i r_i = -\frac{\partial V_i}{\partial x}$$

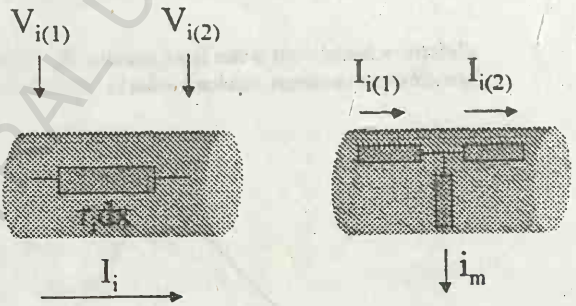


Fig. 69. Reprezentarea simplificată a modelului electric utilizat pentru măsurarea diferenței de potențial transmembranar, în teoria cablului

Cu aceste notații, relația matematică între curentul electric longitudinal și cel transversal care străbate biomembrana este dată de:

$$i_m dx = I_{i(1)} - I_{i(2)} = -\Delta I_i \qquad (13.1)$$

sau:

$$i_m = -\frac{\partial I_i}{\partial x} \qquad (13.2)$$

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

În formula de mai sus, i_m și I_i sunt funcții atât de x, cât și de t.

Combinând aceste relații matematice, pentru expresia diferențiată a lui I_i și formula lui i_m dată mai sus, rezultă:

$$i_m r_i = \frac{\partial^2 V_i}{\partial x^2} \tag{13.3}$$

În cazul cel mai general, diferența de potențial transmembranar pentru axonul considerat este:

$$V = V_i - V_e - V_{Nernst} \tag{13.4}$$

unde:

- V_i este potențialul membranar intracelular
- V_e este potențialul membranar extracelular
- V_{Nernst} este diferența de potențial Nernstian (vezi mai sus)

Din relația de mai sus, rezultă:

$$\frac{\partial V}{\partial x} = \frac{\partial V_i}{\partial x} - \frac{\partial V_e}{\partial x} \tag{13.5}$$

(valoarea potențialului Nernst nu variază cu distanța măsurată în lungul axonului)

Știind că valoarea curentului electric longitudinal măsurat în mediul extracelular este:

$$I_e r_e = -\frac{\partial V_e}{\partial x} \tag{13.6}$$

și ținând cont de legea de conservare a curentului electric (legea I a lui Kirchhoff) pentru schema considerată:

$$i_m = -\frac{\partial I_i}{\partial x} = \frac{\partial I_e}{\partial x} \tag{13.7}$$

prin înlocuire în relația dedusă mai sus, care exprimă dependența curentului transversal prin axon în funcție de diferența de potențial intracelular măsurată în lungul membranei (13.3), rezultă:

$$\frac{\partial^2 V}{\partial x^2} = i_m (r_i + r_e) \tag{13.8}$$

Aceasta este ecuația cablului, ce exprimă legătura matematică între curentul electric membranar transversal și diferența de potențial transmembranar a axonului din modelul considerat.

BCU IAȘI - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

În cazul cel mai general, curentul transversal I_m conține două componente: una capacitivă ($C_m \frac{\partial V}{\partial t}$) și alta ionică, ce apare datorită difuziei ionilor prin membrana biologică a axonului ($\frac{V}{r_m}$).

În aceste condiții, ecuația cablului devine:

$$V + r_m C_m \frac{\partial V}{\partial t} = \left(\frac{r_m}{r_i + r_e} \right) \frac{\partial^2 V}{\partial x^2} \qquad (13.9)$$

şi descrie cantitativ variațiile în timp şi spațiu ale diferenței de potențial transmembranar în cazul axonului considerat.

Dacă se doreşte doar descrierea evoluției temporale a diferenței de potențial transmembranar ce este asociată cu propagarea unui potențial de acțiune, se poate particulariza ecuația de mai sus astfel:

- se consideră că variația în spațiu a diferenței de potențial transmembranar este nulă (experimental, aceasta se poate obține prin procedeul de "fixare spațială" – menținerea unei diferențe de potențial membranare identice pe toată lungimea membranei excitabile, cu ajutorul unor electrozi desfăşurați pe toată lungimea membranei

- în acest fel, termenul $\frac{\partial^2 V}{\partial x^2}$ din ecuația de mai sus devine egal cu zero. Aşadar, în urma unei excitații locale, soluția ecuației ce descrie evoluția diferenței de potențial transmembranar (V) va fi doar o funcție de timp V(t)

- în aceste condiții, dacă se utilizează pentru excitarea locală a membranei excitabile un puls de curent i(t), valoarea totală a curentului membranar transversal i_m va deveni numeric egală cu i(t) – se poate verifica uşor că în condițiile experimentale descrise la punctul precedent, $\frac{\partial I_i}{\partial x}$ este nul

- astfel, ecuația ce descrie variația temporală a diferenței de potențial transmembranar V(t) în membrana excitabilă, ce este generată de un puls de curent i(t), devine:

$$\frac{V}{r_m} + C_m \frac{\partial V}{\partial t} = i(t) \qquad (13.10)$$

unde, în cadrul formalismului Hodgkin-Huxley:

$$r_m = \frac{V}{m^3(t)h(t)\overline{g_{Na}}(V - V_{Na}) + n^4(t)\overline{g_K}(V - V_K) + \overline{g_L}(V - V_L)} \qquad (13.11)$$

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Rezolvarea numerică a acestei ecuații diferențiale neliniare oferă oportunitatea modelării evoluției temporale a unui potențial de acțiune, așa cum a fost exemplificat în subcapitolul anterior.

Pentru aplicarea acestei ecuații în cazul proceselor de propagare a perturbațiilor electrice în membrane excitabile, deosebim două cazuri distincte:

a. Perturbația inițială ($V(x_0, t_0)$ este suficient de mică încât canalele ionice voltaj-dependente nu sunt activate, și deci nu se inițiază propagarea unui potențial de acțiune (`sub-threshold` perturbation).

În acest caz, putem presupune că valoarea lui r_m este o mărime constantă în timp și spațiu (rezistența electrică a unei biomembrane prin care nu se propagă un potențial de acțiune). În această situație, ecuația cablului poate fi rescrisă astfel:

$$\frac{\partial^2 W}{\partial x^2} = \frac{1}{D}\frac{\partial W}{\partial t} \tag{13.12}$$

unde:

$$W(x,t) = V(x,t)e^{\frac{t}{\tau_m}}$$
$$\tau_m = r_m C_m \tag{13.13}$$
$$D = \frac{1}{(r_i + r_e)C_m}$$

Pentru a rezolva ecuația de mai sus, se folosesc relațiile de transformare Fourier ale lui W(x, t) într-o altă funcție Θ de variabile (u,t), după formula:

$$\Theta(u,t) = \int_{-\infty}^{\infty} W(x,t)e^{-nux}dx \tag{13.14}$$

(dacă x are unitatea de măsură m, u va avea unitatea de măsură m^{-1})

Cu această transformare, ecuația cablului de mai sus devine:

$$-u^2\Theta(u,t) = \frac{1}{D}\frac{\partial}{\partial t}\Theta(u,t) \tag{13.15}$$

Impunând condițiile inițiale (la $t = t_0 = 0$ și $x(t_0) = x_0$ $V(x,t) = V(x_0)$, soluția ecuației de mai sus transformată în coordonate (x, t) este dată de:

$$V(x,t) = e^{-\frac{t}{\tau_m}}\left(\frac{\pi}{Dt}\right)^{\frac{1}{2}}\int_{-\infty}^{\infty} e^{-\frac{y^2}{4Dt}}V(x_0 - y)dy \tag{13.16}$$

În cazul ideal, al unei perturbații inițiale punctuale (dată de funcția *delta* la x_0, $V(x_0) = v_0\delta(x)$), soluția ecuației de mai sus devine:

BCU CLUJ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

$$V(x,t) = v_0 \left(\frac{\pi}{Dt}\right)^{\frac{1}{2}} e^{-\frac{t}{\tau_m}} e^{-\frac{x^2}{4Dt}} \qquad (13.17)$$

Această ecuaţie descrie modul în care se atenuează în timp şi spaţiu o perturbaţie electrică iniţială într-o membrană excitabilă, care însă nu a fost excitată suficient la momentul iniţial, pentru a iniţia potenţiale de acţiune propagabile (vezi Fig. 70).

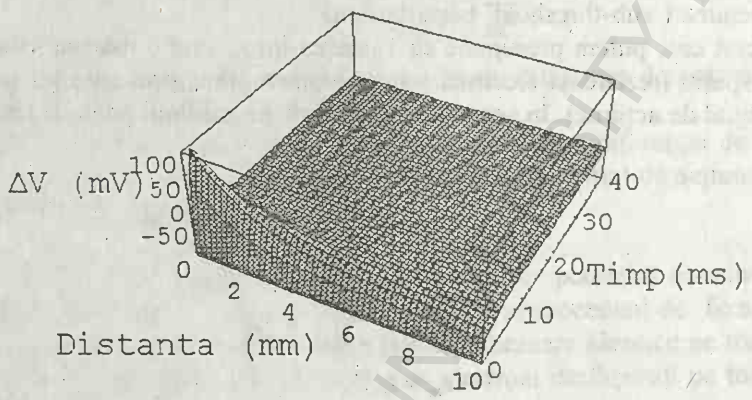


Fig. 70. Simularea propagării unei perturbaţii electrice într-o membrană neexcitabilă (sau excitabilă, însă depolarizată insuficient – `*sub-threshold*`), în formalismul teoriei cablului (***Tudor Luchian, rezultate nepublicate***)

Dacă membranele biologice nu ar conţine canale ionice voltaj-dependente, sau dacă aceste canale ionice există, însă perturbaţia electrică iniţială a fost prea mică, şi deci aceste canale nu s-au activat – regimul `sub-threshold`, o perturbaţie iniţială locală în diferenţa de potenţial membranar s-ar atenua rapid în timp şi spaţiu, după formula dată mai sus. În acest caz, comunicarea intercelulară ar fi inexistentă, deoarece în membrana excitabilă nu există potenţiale de acţiune propagabile (aşa cum sunt observate experimental, în anumite condiţii – vezi mai sus). Pentru a se asigura continuitatea transmiterii informaţiei în celulele excitabile, este suficient ca acestea să fie perturbate electric iniţial în aşa fel, încât în punctul de excitaţie canalele ionice voltaj-dependente să devină activate (vezi mai jos).

b. Perturbaţia iniţială ($V(x_0, t_0)$ este suficient de mare încât canalele ionice voltaj-dependente devin activate, şi deci se iniţiază propagarea unui potenţial de acţiune (`threshold` perturbation).

Este foarte important de remarcat ca, în situația descrisă mai sus, valoarea **rezistentei biomembranei** ($r_m = \frac{V}{I_{ionic}}$) **variază în timp și cu valoarea diferenței de potențial transmembranar**: (vezi expresia curentului ionic printr-o membrană excitabilă ce conține canale ionice de sodiu și potasiu, în formalismul lui Hodgkin-Huxley descris mai sus)

$$I_{ionic}(t) = m^3(t)h(t)\overline{g_{Na}}(V - V_{Na}) + n^4(t)\overline{g_K}(V - V_K) + \overline{g_L}(V - V_L) \quad (13.18)$$

Perturbarea electrică (i.e., diferența de potențial) propagabilă este o mărime ce variază atât în timp, cât și în spațiu. Pentru a determina analitic soluția ecuației cablului pentru o membrană excitabilă (V(x, t)), trebuie rezolvat următorul sistem de ecuații:

$$V + r_m C_m \frac{\partial V}{\partial t} = \left(\frac{r_m}{r_i + r_e}\right)\frac{\partial^2 V}{\partial x^2} \quad (13.21)$$

$$r_m = \frac{V}{m^3(t)h(t)\overline{g_{Na}}(V - V_{Na}) + n^4(t)\overline{g_K}(V - V_K) + \overline{g_L}(V - V_L)}$$

$$\frac{dn}{dt} = \alpha_n(1 - n) - \beta_n n$$

$$\frac{dm}{dt} = \alpha_m(1 - m) - \beta_m m$$

$$\frac{dh}{dt} = \alpha_h(1 - h) - \beta_h h$$

unde semnificația fizică a termenilor este așa cum a fost descrisă în paragrafele precedente, iar ratele de tranziție α_n, α_m, α_h, β_n, β_m și β_h sunt voltaj-dependente și expresia analitică a variației lor cu potențialul de membrană poate fi determinată experimental (vezi mai sus – modelul Hodgkin-Huxley).

Pentru un model specific de membrană biologică, în care valoarile lui V_{Na} și V_K au fost alese 50 și respectiv –77 mV iar valorile maxime (în unități relative) ale lui $\overline{g_{Na}}$ si $\overline{g_K}$ au fost alese 20 și respectiv 3, variația temporală și cu diferența de potențial a curenților ionici de sodiu și potasiu, așa cum este descris mai sus în cadrul formalismului Hodgkin-Huxley, este reprezentată în figurile următoare.

Sistemul de ecuații de mai sus este un sistem cuplat de patru ecuații neliniare diferențiale, și rezolvarea lui se poate face numeric. Rezolvarea acestui sistem de ecuații dă informații despre valorile diferenței de potențial transmembranar, la orice moment de timp, în locații precizate de pe membrană, în vecinătatea punctului de excitație.

BCU - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

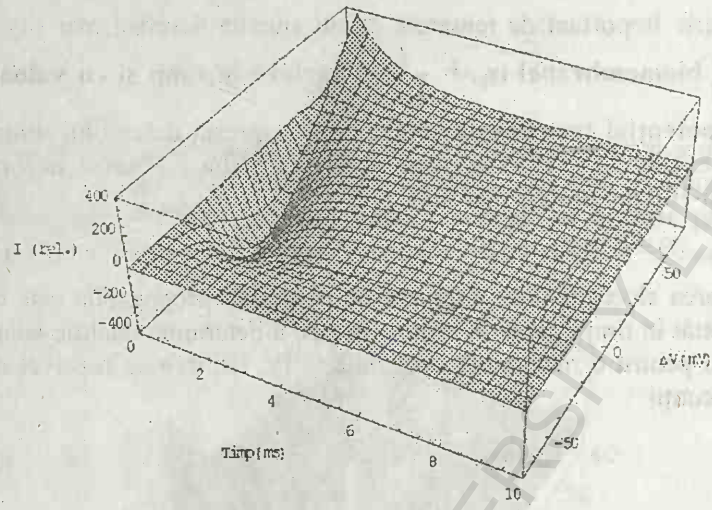


Fig. 71. Simularea variaţiei în timp şi a dependenţei de potenţialul de depolarizare a curentului de sodiu într-o membrană excitabilă, în cadrul formalismului Hodgkin-Huxley (*Tudor Luchian, rezultate nepublicate*)

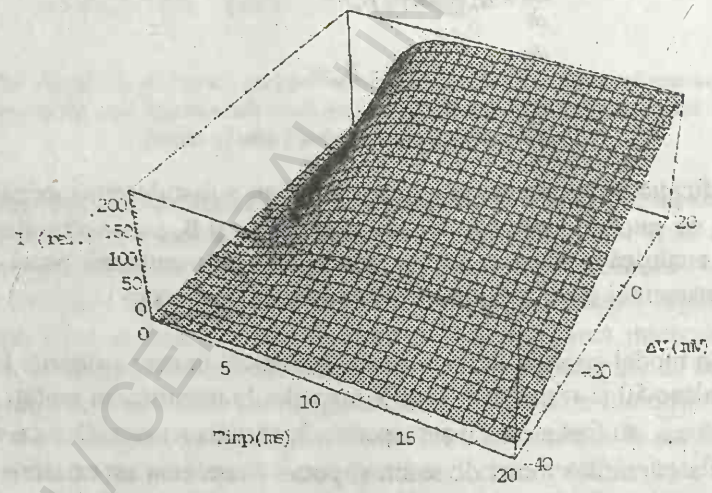


Fig. 72. Simularea variaţiei în timp şi a dependenţei de potenţialul de depolarizare a curentului de potasiu într-o membrană excitabilă, în cadrul formalismului Hodgkin-Huxley (*Tudor Luchian, rezultate nepublicate*)

Este foarte important de observat următorul aspect legat de soluţia ecuaţiei cablului pentru o membrană excitabilă: această soluţie *per se* **nu** conţine termeni

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

care să sublinieze caracterul de propagare neperturbată în spațiu a excitației nervoase (asa cum se observă experimental – vezi mai sus). Trebuie remarcat că ecuația cablului în acest caz nu este echivalentă cu ecuația unei unde clasice, nici măcar formal:

$$\Delta\Psi = \frac{1}{u^2}\frac{\partial^2\Psi}{\partial t^2} \qquad (13.22)$$

Ecuația generală a unei unde (vezi mai sus) conține intrinsec, prin forma sa matematică, caracterul de propagabilitate periodică în timp și spațiu a mărimii studiate (Ψ). Pentru a evita eventuale confuzii, în ecuația (13.22) simbolul 'Δ' desemnează operatorul Laplaceian.

Cu toate că există diferențe esențiale între ecuația clasică a unei unde și ecuația cablului pentru o membrană excitabilă, din rezultate experimentale precum și simulări pe computer, se observă caracterul fizic de propagabilitate spațială a unei depolarizări membranare inițiale, localizată spațial, și care depășește o anumită valoare de prag ('threshold').

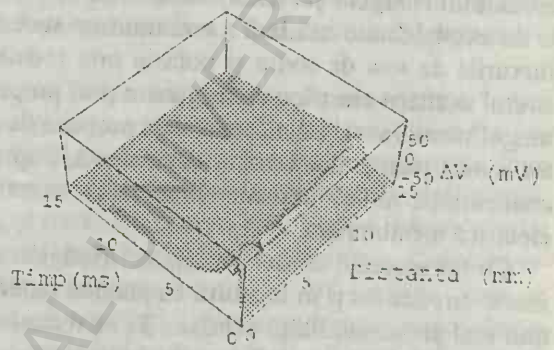


Fig. 73. Simularea propagării unui potențial de acțiune (variația spațio-temporală a diferenței de potențial transmembranar) într-o membrană excitabilă, așa cum este dedusă în cadrul modelului Hodgkin-Huxley (*Tudor Luchian, rezultate nepublicate*)

Explicația apariției în condiții externe favorabile (i.e., depolarizare membranară critică) în membranele biologice excitabile a unui potențial de acțiune propagabil rezidă exclusiv în modul de organizare lipo-proteic particular al membranelor excitabile, care conțin inserate proteine integrale specifice denumite canale ionice voltaj-dependente.

Datorită existenței canalelor ionice voltaj-dependente cu proprietăți electrice neliniare, vezi formalismul Hodgkin-Huxley și capitolele următoare, o perturbație electrică inițiată în punctul x = 0 de pe biomembrană (de exemplu, o depolarizare a membranei de la un potențial de repaus de –70 mV până la –30 mV) poate atinge valori chiar mai mari într-un punct din imediata vecinătate, deoarece în acel punct se activează canalele ionice voltaj dependente, ce produc variații dramatice ale conductanței, și implicit rezistentei membranei biologice (vezi formalismul Hodgkin-Huxley). În acest caz, perturbația inițială este percepută amplificată în locul (x), unde ea a interacționat cu aceste canale ionice, și procesul este

cunoscut sub numele de iniţiere a unui potenţial de acţiune propagabil. Deoarece canalele ionice sunt răspândite discret pe toată lungimea axonului şi a membranelor excitabile, o perturbaţie electrică iniţială într-o astfel de membrană *nu* se atenuează în spaţiu, cum a fost descris mai sus, ci provoacă, prin mecanisme moleculare perfect identice ca mai sus, propagarea din aproape în aproape a altor perturbaţii locale denumite potenţiale de acţiune locale. Acest proces este denumit propagare a informaţiei nervoase în membranele excitabile.

Hodgkin şi Huxley au rezolvat numeric ecuaţia cablului cu ajutorul unui calculator pentru operaţii aritmetice elementare (în acea perioadă nu erau dezvoltate computere şi software dedicate rezolvării accesibile a ecuaţiilor diferenţiale) şi au reprezentat grafic simularea propagării unui potenţial de acţiune. Succesul modelului Hodgkin şi Huxley în încercarea de a explica fenomenologic procesele de excitabilitate celulară a constituit un succes al metodelor biofizicii clasice; fluxurile de ioni de sodiu şi potasiu prin membrana excitabilă constituiau substratul excitării electrice membranare şi al propagării unei perturbaţii electrice în lungul membranei, iar mecanismele propuse de ei pentru a modela permeabilitatea ionică membranară voltaj-dependentă, împreună cu existenţa gradienţilor de concentraţie ionică transmembranară au putut explica rezonabil excitabilitatea electrică membranară.

Cu tot succesul teoriei prezentate, Hodgkin şi Huxley au rămas în continuare foarte circumspecţi în legătură cu puterea modelului lor de a surprinde mecanismul real al excitabilităţii celulare. Ei au recunoscut întotdeauna că modelul cinetic prezentat de ei poate fi dezvoltat oricât de complicat, şi că nu trebuie privit ca reprezentarea ultimă a proceselor electrice din membranele excitabile:

'***Certain features of our equations [are] capable of physical interpretation, but the success of our equations is no evidence in favor of the mechanism of permeability change that we tentatively had in mind when formulating them***' (Hodgkin şi Huxley, 1952)

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

14. Canale ionice. Funcție, structură şi clasificare

În capitolele precedente am introdus formal noțiunea de 'canal ionic', iar când am discutat despre fenomenele de transport membranar nu am menționat deloc mecanismele moleculare ce constituie substratul difuziei ionice prin membranele biologice. În mod natural, moleculele sau atomii încărcați electric net nu pot difuza spontan dintr-o soluție apoasă ($\varepsilon_r \sim 80$) printr-o membrană biologică ($\varepsilon_r \sim 2$), datorită energiei lor foarte mari, comparabilă cu tăria legăturii covalente, de de-hidratare (pentru detalii de mecanism fizic, vezi capitolele anterioare – Energia Born).

Cu toate acestea, toate celulele vii păstrează gradienți de concentrații ionice (ioni anorganici) între mediul intra şi extracelular. Acești gradienți ionici fac posibilă comunicarea electrică intercelulară, bazată în special pe activitatea unor proteine membranare integrale numite canale ionice. În termenii cei mai simpli, canalele ionice formează pori apoşi transmembranari care permit difuzia ionilor prin membrana biologică, în virtutea gradientului lor electrochimic. Canalele ionice permit transportul ionilor cu rate cuprinse între $10^6 - 10^8$ ioni/sec., ceea ce dă naştere la curenți ionici individuali (mediați de un singur canal ionic) de ordinul $10^{-12} - 10^{-10}$ amperi. Acești curenți electrici individuali sunt suficient de mari pentru a produce schimbări rapide ale diferenței de potențial transmembranar şi să se constituie astfel în substratul molecular al comunicării electrice celulare, prin intermediul potențialelor de acțiune propagabile.

Cele mai multe canale ionice sunt caracterizate cinetic de închiderea şi deschiderea stochastică a porului apos. Această proprietate se numeşte 'gating' şi se materializează fizic prin intermediul tranzițiilor aleatoare între conformații neconductoare şi conductoare ale canalelor ionice pentru transportul ionic. Proprietatea de 'gating' este influențabilă de interacțiunea canalului ionic cu molecule extracelulare, mesageri secundari intracelulari, metaboliți, procese de fosforilare etc. Unul dintre cei mai importanți factori fizici care afectează gating-ul canalelor ionice implicate în conducerea potențialelor de acțiune îl constituie diferența de potențial transmembranar.

Pentru a înțelege mai bine noțiunea de 'gating', vom anticipa acum unele aspecte esențiale ale sale. În figura de mai jos (Fig. 74) este prezentată o înregistrare experimentală a curentului electric macroscopic mediat de canalele ionice de potasiu, activate în urma depolarizării membranei celulare.

După cum se observă, variația în timp a curentului ionic macroscopic urmează o lege temporală deterministă (Fig. 74, panel B), iar repetarea acestui experiment în condiții de laborator perfect identice conduce la obținerea unor curenți ionici macroscopici cu proprietăți cinetice similare. În condiții experimentale speciale, există posibilitatea înregistrării curentului ionic mediat de un singur canal ionic din întreaga populație prezentă în membrana celulară. Spre deosebire de observarea unui curent macroscopic, obținut în urma înregistrării funcționării simultane a mai multor canale ionice, tehnica 'patch-clamp', care va fi detaliată în capitolele următoare, permite extragerea unei singure proteine din întreaga populație de canale ionice active şi analizarea curentului electric mediat de aceasta. În acest caz, se observă că proprietățile cinetice ale curenților ionici individuali diferă radical de cele ale curentului macroscopic (Fig. 74, panel A); curentul electric printr-un singur canal ionic variază abrupt, iar durata temporală pentru care canalul ionic este în stare conductoare sau neconductoare este o mărime stochastică. Proprietățile cinetice ale canalelor ionice individuale sunt deci caracterizabile doar în termeni probabilistici, iar tranzițiile bruşte observate în starea de conductivitate a unui canal ionic reflectă proprietatea sa de 'gating' şi au corespondent fizic în orientările specifice ale unui domeniu proteic definit (denumit 'gate' – poartă). Acest domeniu de aminoacizi (i.e., poarta) îşi schimbă orientarea conformațională în mod stochastic permițând difuzia ionilor prin canalul ionic în maniera aleatoare: interacțiunea între canalul ionic şi diferiți stimuli (electrici, chimici, mecanici, electromagnetici) conduce la alterarea ratelor de tranziție ale canalului ionic dintr-o stare moleculară (conductivă sau nu) în alta, în care proprietățile de conducție sunt modificate.

Cea mai simplă diagramă cinetică a unui canal ionic analizat individual este reprezentată ca o serie de tranziții aleatorii între două stări, cu proprietăți conductive diferite ('închis' – conductanță nulă, 'deschis' – conductanță ne-nulă):

$$\text{'închis'} \underset{\beta}{\overset{\alpha}{\Leftrightarrow}} \text{'deschis'} \qquad (14.1)$$

În cazul canalelor ionice voltaj-dependente, despre care s-a menționat în capitolul anterior, o modificare (depolarizare) a diferenței de potențial transmembranar conduce alosteric la modificarea ratelor de tranziție între stările 'închis' şi 'deschis' ale canalelor ionice individuale. Rezultatul macroscopic net, evidențiat în Fig. 74, panel B, prin medierea curenților electrici individuali, este creşterea curentului ionic, după o lege temporală cu caracter deterministic – vezi în acest capitol demonstrația matematică. În acest fel, spunem că modificarea diferenței de potențial transmembranară a alterat proprietățile de 'gating' ale canalelor ionice, fapt dovedit de modificarea caracteristicii de conductivitate (i.e., magnitudinea curentului electric mediat) a ansamblului de canale ionice.

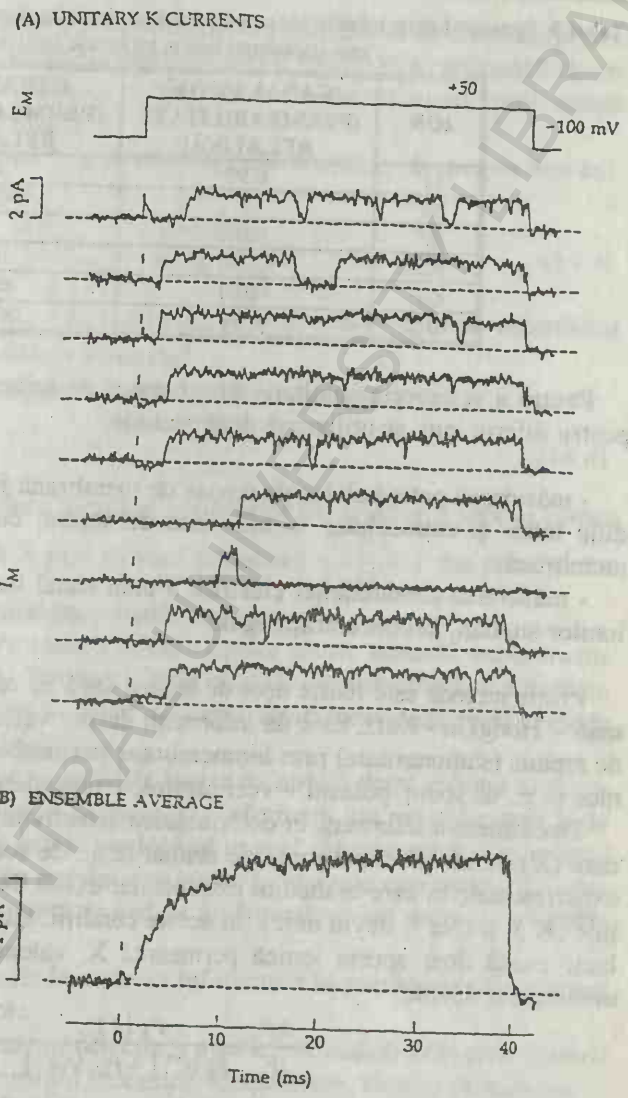


Fig. 74.

Înregistrare *'patch-clamp'* a curentului ionic de potasiu mediat de canalele ionice de potasiu din axonul de calmar (I_K), după cum rezultă în urma depolarizării membranare de la –100 la +50 mV.

În panelul (A) sunt prezentate nouă înregistrări succesive ale curentului electric de potasiu de tip *'patch-clamp'*. În panelul (B) este prezentat rezultatul mediерii statistice (*'ensemble average'*) a înregistrărilor experimentale din panelul precedent, ce exprimă dependența temporală a lui I_K așa cum ar fi înregistrată în urma măsurătorilor macroscopice a curentului ionic de potasiu [*Ionic Channels of Excitable Membranes, 1992. Hille, B.*]

Nomenclatura canalelor ionice se stabilește în funcție de tipul ionilor pentru care ele au permeabilitate maximă în condiții fiziologice normale. Trebuie reținut însă că, de exemplu, chiar dacă un canal de sodiu este permeabil mai ales pentru ionii de sodiu, aceasta nu înseamnă că alți ioni sunt total excluși de la difuzia mediată de el. În tabelul de mai jos sunt prezentate pentru exemplificare permeabilitățile relative ale canalelor ionice de sodiu și potasiu pentru alți ioni fiziologici.

BCU CENTRALA UNIVERSITARA

Tabel 9. Permeabilităţile relative ale canalelor ionice de sodiu şi potasiu pentru câţiva dintre cei mai importanţi ioni în procesele biofizice

ION	CANAL DE Na^+ (PERMEABILITATE RELATIVĂ)	CANAL DE K^+ (PERMEABILITATE RELATIVĂ)
Li^+	0.93	<0.01
Na^+	1	<0.01
K^+	0.09	1
Rb^+	< 0.01	0.91
Cs^+	<0.01	<0.08
NH_4^+	0.16	0.14

Pentru a se aprecia cantitativ proprietatea de selectivitate a canalelor ionice pentru diferiţi ioni, se utilizează două metode:

- măsurarea potenţialelor de repaus de membrană în condiţiile în care în mediile intra- şi extracelular se află ionii de studiu, cu selectivităţi diferite prin membrană;
- măsurarea conductanţei electrice a unui canal ionic, în prezenţa separată a ionilor studiaţi, în concentraţii egale

Prima metodă este foarte uşor de înţeles dacă ne reamintim formula lui Goldman – Hodgkin - Katz, care dă informaţii despre valoarea diferenţei de potenţial de repaus (staţionaritate) prin biomembrane permeabile pentru diferite specii ionice (e.g., de sodiu, potasiu - vezi capitolele precedente).

Dacă suntem interesaţi în determinarea selectivităţii unui ion permeant oarecare (X), printr-un canal ionic de studiat (e.g., de sodiu), se pot realiza condiţii experimentale în care în mediul extracelular există doar acel ion (i.e., concentraţiile $(K^+)_o$ şi $(Na^+)_o$ devin nule). În aceste condiţii, atunci când în mediul extracelular există doar specia ionică permeantă X, valoarea potenţialului de repaus membranar devine:

$$V^X_{repaos} = \frac{RT}{zF} \ln \frac{P_X (X)_o}{P_K \left(K^+\right)_i + P_{Na} \left(Na^+\right)_i} \qquad (14.2)$$

(în soluţii concentrate, în loc de valoarea concentraţiei unei specii ionice se utilizează valoarea activităţii sale – vezi *Teoria Debye-Huckel*)

Se vede din această formulă că, dacă s-ar cunoaşte cu exactitate concentraţia citosolică a speciilor ionice de potasiu şi sodiu, am putea evalua permeabilitatea absolută (P_X) a speciei ionice X prin canalul de sodiu studiat. Deoarece aceste

deteminări de concentrații ionice intracelulare sunt mai dificil de efectuat, pentru a deduce informații despre selectivitatea unui specii ionice X, se utilizează *determinări relative*, în care se evaluează *permeabilitatea relativă* a unei specii ionice X în raport cu o altă specie ionică, Y.

Scrisă pentru specia ionică Y și în condiții experimentale identice ca mai sus, formula scrisă anterior devine:

$$V^{Y}_{repaos} = \frac{RT}{zF} \ln \frac{P_Y (Y)_o}{P_K \left(K^+\right)_i + P_{Na} \left(Na^+\right)_i} \qquad (14.3)$$

Aceste mărimi fizice (i.e., V^{X}_{repaos} și V^{Y}_{repaos}) sunt relativ ușor de determinat experimental (vezi în capitolele precedente).

Prin operația de scădere algebrică a acestor două expresii, rezultă:

$$V^{Y}_{repaos} - V^{X}_{repaos} = \frac{RT}{zF} \ln \frac{P_Y (Y)_o}{P_X (X)_o} \qquad (14.4)$$

În acest fel, se poate deduce expresia permeabilității relative a speciei ionice Y în raport cu specia ionică X prin canalul de sodiu ($\frac{P_Y (Y)_o}{P_X (X)_o}$), din determinări simple de diferențe de potențial transmembranar.

Cealaltă metodă de determinare a selectivităților ionice necesită experimente mai laborioase, în care este necesară înregistrarea experimentală a activității electrice a unei biomembrane la nivel de canal ionic individual (vezi metoda 'patch-clamp').

Se poate aprecia că, evolutiv, canalele ionice au apărut drept rezultat al necesității celulelor de a fi capabile să recepționeze informații din mediul extern și de a le transmite ulterior la alte celule, înglobând în acel răspuns propria sa contribuție de informație. În lumina acestui argument, evidențele experimentale adunate până acum arată că, din punct de vedere funcțional, există două clase fundamentale de canale ionice:

1. canale ionice specializate în codarea informației în potențialele de acțiune și medierea propagării acestora;
2. canale ionice specializate în detecția și apoi transducerea diferiților stimuli exogeni, cum ar fi: lumina, tensiuni mecanice, temperatura, stimuli chimici etc.

Canalele ionice implicate în generarea semnalelor electrice propagabile în membranele excitabile sunt grupate în două mari categorii:

A. canale ionice al căror 'gating' este modulat de interacțiunea lor cu molecule specifice (agonisti) și care sunt cunoscute sub numele de LGIC ('ligand gated ion channels')

B. canale ionice al căror 'gating' este modulat de interacţiunea lor cu un câmp electric transmembranar şi care sunt cunoscute sub numele de VGIC ('voltage gated ion channels')

LGIC reprezintă o familie foarte importantă de proteine specializate în medierea transmisiei informaţiei sinaptice, prin interacţiunea specifică a lor cu o clasă particulară de agonişti, numiţi neurotransmiţători (e.g., acetilcolina, glicina, glutamat, dopamina, serotonina, histaminele, ATP-ul)

În tabelul de mai jos este prezentată o listă comprehensivă a celor mai importanţi LGIC, împreună cu agoniştii lor specifici:

Tabel 10. Agoniştii specifici pentru câţiva dintre cei mai importanţi LGIC (*'ligand gated ion channels'*)

TIP FUNCŢIONAL	AGONIST	LGIC
Receptori excitatori	Acetilcolina	Na^+/K^+
	Glutamat	Na^+/K^+ and Ca^{2+}
	Serotonina (clasa $5HT_3$)	Na^+/K^+
Receptori inhibitori	GABA (γ-aminobutyric acid)	Cl^-
	Glicina	Cl^-

În tabelul de mai sus, numele LGIC-ului indică ionii permeabili prin canalul ionic. După cum vom prezenta şi în paragrafele următoare, o trăsătură foarte importantă a acestor clase de proteine o reprezintă caracterul lor dual: de receptor pentru un agonist specific şi de proteină ce mediază difuzia ionică prin membrane (i.e., canal ionic). Interacţiunea specifică între molecule de ligand şi LGIC determină schimbări conformaţionale de structură ale acestora, fapt ce cauzează activarea (deschiderea) porţii canalului ionic. Se reprezintă în tabel faptul că primele trei tipuri de LGIC permit difuzia cationilor prin membrana biologică, provocând depolarizarea membranei postsinaptice şi, implicit, excitarea ţesutului post-sinaptic; de aceea aceştia sunt denumiţi receptori excitatori. Ultimele două tipuri de LGIC devin permeabile pentru anioni şi determină hiperpolarizarea ţesutului post-sinaptic, fiind denumiţi receptori inhibitori. Modificarea diferenţei de potenţial transmembranar a ţesutului post-sinaptic se realizează într-un interval foarte scurt de timp (0.1 – 2 ms) după interacţiunea LGIC cu agonistul specific; din acest motiv, sinapsele constituite prin intermediul acestor LGIC se numesc sinapse rapide.

Foarte multe funcţii din sistemul nervos se desfăşoară însă cu o cinetică lentă, de ordinul secundelor sau chiar minutelor. În aceste cazuri, informaţia sinaptică este mediată de o clasă specială de LGIC, denumită proteina G – LGIC. Spre

deosebire de LGIC-urile discutate anterior, în care receptorul pentru agonist și canalul ionic reprezentau una și aceiași proteină, în cazul proteinei G – LGIC, canalul ionic și receptorul pentru agonist reprezintă două entități proteice distincte. Interacțiunea dîntre neurotransmițător și receptor determină activarea unei proteine cu rol unic în comunicarea inter-celulară (proteina G), care, prin cuplarea cu enzime specifice (e.g., adenilat-ciclaza, fosfolipaza C), determină generarea unor molecule intermediare în transmiterea informației, denumite mesageri de ordinul 2, cum ar fi cAMP, ioni de Ca^{2+}. Mesagerii de ordinul 2 sunt cei care interacționează cu canale ionice ce au afinitate pentru ei, modulându-le astfel permeabilitatea ionică. Sinapsele cu o asemenea arhitectură moleculară a transmisiei de informație se numesc sinapse lente.

Mai jos este schițată diferența dintre mecanismele de activare ale LGIC ce intră în arhitectura celor două tipuri de sinapse, rapide și lente:

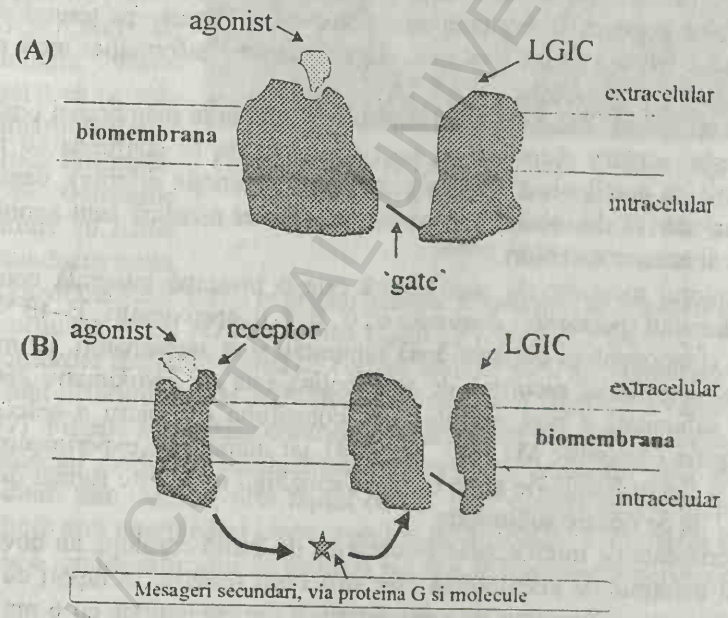


Fig. 75. Reprezentare simplificată a topologiei și mecanismului molecular de funcționare ale LGIC (*'ligand-gated-ion-channels'* – vezi text) ce intră în arhitectura celor două tipuri de sinapse: sinapse rapide (A) și sinapse lente (B)

Deoarece receptorul nicotinic de acetilcolină a fost primul canal ionic al cărui 'gating' este modulat de interacțiunea agoniști specifici (LGIC) și care a fost purificat, clonat și caracterizat la nivel molecular îl voi considera drept exemplu

în cele ce urmează pentru prezentarea mecanismelor de structură şi mecanism de funcţionare a LGIC.

14.1. *Canale ionice ligand-dependente. Receptorul nicotinic de acetilcolină*

Având în vedere prezentarea anterioară, în procesul conducţiei informaţiei nervoase între organe celulare presinaptice şi postsinaptice, neurotransmiţătorii eliberaţi de membrana presinaptică (e.g., acetilcolina) difuzează în spaţiul sinaptic, interacţionează cu membrana postsinaptică şi aceasta conduce la creşterea rapidă a conductanţei acesteia pentru ionii de sodiu şi potasiu. Întregul proces durează ~ 0.1 ms, curentul de sodiu tip 'inward' rezultat depolarizează membrana postsinaptică, de la o diferenţă de potenţial de repaus de ~ -60 mV la ~ -15 mV. Aceasta conduce la iniţierea unui potenţial de acţiune pe ţesutul postsinaptic. În acest fel se asigură continuitatea transmiterii informaţiei între cele două ţesuturi, pre- şi postsinaptic.

Structura proteică responsabilă pentru depolarizarea membranei postsinaptice se numeşte receptor nicotinic de acetilcolină (a nu se confunda cu receptorul muscarinic de acetilcolină, care are structură şi funcţie diferite); denumirea de 'nicotinic' derivă din observaţia că moleculele de nicotină sunt agonişti foarte eficienţi ai acestor receptori.

Receptorul nicotinic de acetilcolină este o proteină integrală compusă din cinci subunităţi (pentamer) denumite α, α, β, γ, δ; aproximativ 35-40 % din aminoacizii componenţi ai oricăror două subunităţi sunt asemănători, iar masa moleculară a receptorului nicotinic de acetilcolină este de aproximativ 260.000 Da. Fiecare subunitate a pentamerului este constituită din patru α-helix-uri transmembranare (denumite M1, M2, M3, M4), iar numeroase experimente de mutageneză şi electrofiziologie arată că porul canalului ionic este format din α-helix-urile M2 de pe fiecare subunitate.

Experimente de microscopie electronică de înaltă rezoluţie au dovedit că receptorul nicotinic de acetilcolină este structurat simetric în raport cu cele cinci subunităţi, are un diametru de aproximativ 9 nm, se extinde cu 6 nm în mediul extracelular şi 2 nm în citosol (Fig. 76 şi Fig. 77).

Utilizarea tehnicilor de biologie moleculară modernă (e.g., mutageneza la nivel de aminoacid, clonarea mARN-ului) au dezvăluit noi evidenţe experimentale ale rolului jucat de domeniile M2 în constituirea porului receptorului nicotinic de acetilcolină. Imediat ce a fost stabilit că aminoacizi încărcaţi electric negativ (glutamat, aspartat) sunt situaţi în ambele părţi (intra- şi extracelulară) ale

domenilor polipeptidice M2, următorul pas logic a fost de a se realiza mutanți genetici, în care aceste reziduuri de pe o singură subunitate a canalului ionic au fost substituite cu aminoacizi încărcați electric pozitiv (lizina) și apoi exprimate genetic în sisteme celulare naturale, împreună cu alte patru subunități nealterate genetic (*'wild-type'*). Măsurători de electrofiziologie ulterioare au arătat că pe măsură ce numărul reziduurilor aspartice sau glutamice de pe domeniile M2 substituite cu lizina crește, conductivitatea electrică a canalului ionic astfel exprimat genetic în sistemul de expresie naturală scade proporțional. Acest rezultat indică faptul că reziduurile aspartice și glutamice sunt ordonate spațial în formă de cerc pe ambele părți ale membranei biologice și că sunt determinante în stabilirea conductivității electrice a canalului ionic (Fig. 77). Fiecare subunitate contribuie la acest 'cerc' cu un asemenea reziduu. Mecanismul modulării conductivității electrice a canalului ionic de către aceste reziduuri este explicat prin faptul că ele, prin sarcina netă negativă purtată, contribuie prin intermediul interacțiunilor electrostatice la creșterea concentrației locale a ionilor difuzanți de sodiu și potasiu în apropierea porului canalului ionic.

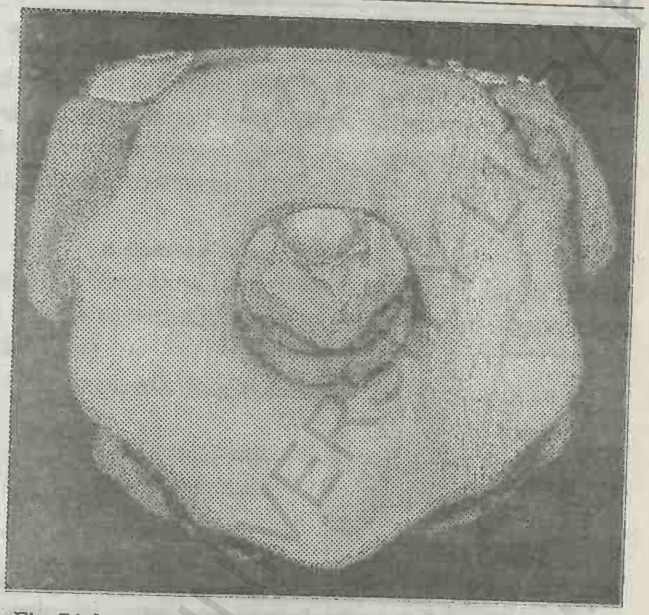


Fig. 76. Imaginea receptorului nicotinic de acetilcolină, așa cum a fost dedusă din experimente de microscopie electronică de înaltă rezoluție [*Molecular Cell Biology (3rd edition), 1995. Lodish, H. et al*]

Pentru a obține informații despre modelul cinetic al activării receptorului nicotinic de acetilcolină, Magleby și Stevens (1972) au realizat experimente electrofiziologice pe placa motorie de pe muschiul *sartorius*, în care au înregistrat curentul electric prin membrana post-sinaptică în urma excitării electrice repetate a neuronului pre-sinaptic, la diferite diferențe de potențial transmembranar (în condiții de 'voltage-clamp') ale membranei post-sinaptice (Fig. 78).

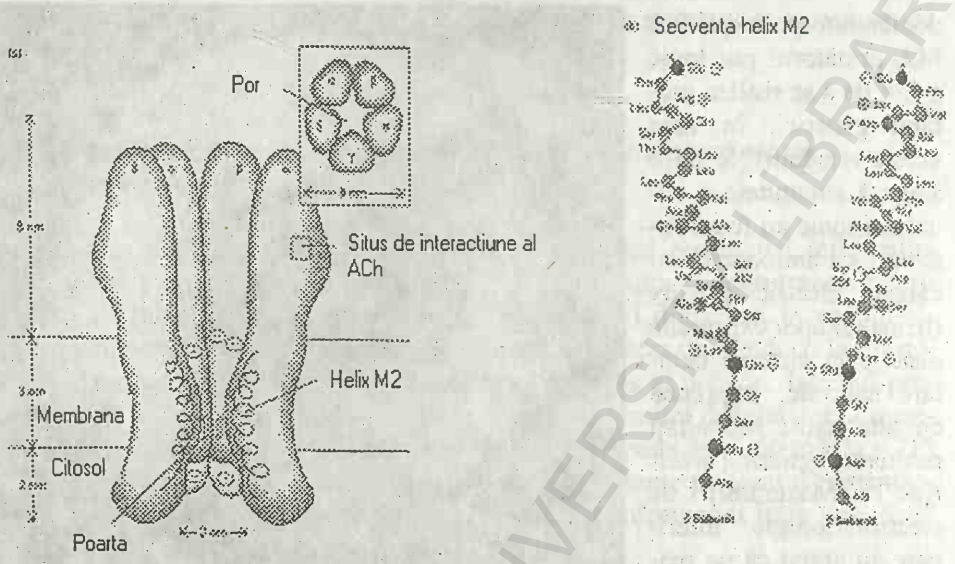


Fig. 77. (A) Reprezentarea schematică a receptorului de acetilcolină, cu evidenţierea topologiei subunităţilor $\alpha_2\beta\gamma\delta$; pentru claritatea reprezentării, subunitatea γ nu a fost arătată. Pe fiecare subunitate α esta prezentat schematic situsul de interacţiune cu acetilcolina. În inset este prezentată o secţiune transversală prin receptor, care arată modul de organizare al celor cinci monomeri în jurul porului central al receptorului. (B) Secvenţa de aminoacizi ce constituie domeniile M2 în subunităţile β şi δ ale receptorului de acetilcolina. De remarcat prezenţa aminoacizilor încărcaţi electric negativ (glutamat şi aspartat) la ambele capete ale domeniilor M2, cu rol în proprietatea de selectivitate ionicăa receptorului (vezi text) [după *Unwin, N. 1993. Cell 72*]

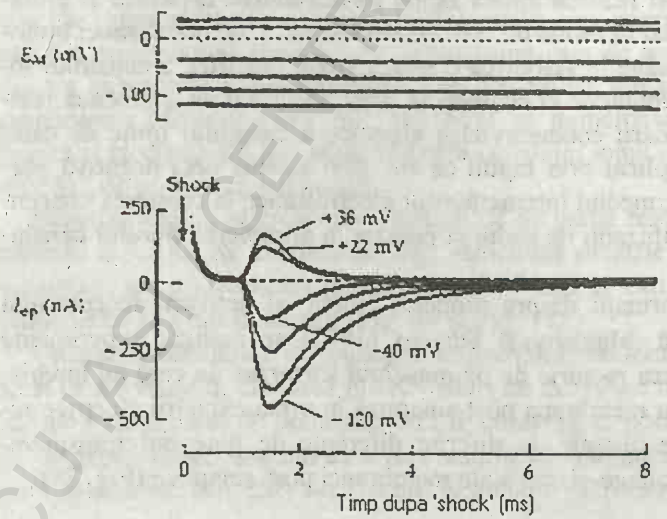


Fig. 78.

Înregistrări ale curentului electric ce apare în urma activării receptorului nicotinic de acetilcolină prin membrana post-sinaptică, în urma excitării electrice repetate a neuronului pre-sinaptic, la diferite diferenţe ale potenţialului transmembranar (în condiţii de '*voltage-clamp*') ale membranei post-sinaptice. '*Shock*' reprezintă momentul în care s-a excitat neuronul pre-sinaptic. [după *Ionic Channels of Excitable Membranes, 1992. Hille, B.*]

BCU IAŞI CENTRU UNIVERSITAR LIBRARY

Se observă din figura de mai sus că, în urma excitării electrice pre-sinaptice și după o anumită perioadă de latență ('time after shock'), necesară pentru propagarea potențialului de acțiune pe nervul pre-sinaptic și începerea exocitozei neurotransmițătorilor, membrana post-sinaptică devine permeabilă pentru conducția ionică. În acest caz, curentul transmembranar are două faze cinetice distincte:

- o fază de creștere rapidă a curentului ionic transmembranar, dar nu instantanee (deoarece timpul de difuzie al neurotransmițătorilor în spațiul sinaptic spre receptori este foarte mic, dar finit)
- o fază de descreștere exponențială (rata de descreștere este notată cu α)

K. L. Magleby și C. F. Stevens au considerat două mecanisme posibile, responsabile pentru faza de descreștere a curentului ionic înregistrat în condițiile expuse mai sus:

a. Moleculele de neurotransmițător (acetilcolina) din spațiul sinaptic dispar (prin mecanisme de endocitoză, descompunere) după o lege temporală exponențială, cu rata α.

b. Moleculele de neurotransmițător (acetilcolina) din spațiul sinaptic dispar mult prea repede (în comparație cu constanta de timp a amplificatoarelor și electrozilor utilizați), însă rata naturală a tranziției 'deschis'–'închis' a canalului ionic este α.

Prima ipoteză a fost exclusă, deoarece nu putea explica dependența de voltaj a lui α (rata de descreștere a curentului ionic post-sinaptic este de aproape patru ori mai mare la + 38 mV decât la – 120 mV) și dependența sa de temperatură (Q_{10} = 2.8, care este mult prea mare dacă un proces de difuzie ar fi responsabil de această cinetică a curentului ionic).

Pornind de la aceste observații, Magleby și Stevens au elaborat următorul model cinetic pentru descrierea interacțiunii dintre acetilcolina și receptor:

$$A + R \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\Leftrightarrow}} AR \underset{\alpha}{\overset{\beta}{\Leftrightarrow}} AR^* \qquad (14.5)$$

În schema de reacție de mai sus, semnificația stărilor moleculare este următoarea:

- R (receptor)
- AR (complex molecular receptor – acetilcolină neactivat)

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- AR^* (complex molecular receptor – acetilcolină activat) (A semnifică moleculele de acetilcolină)

Drept mecanism al reacţiei de interacţiune, Magleby şi Stevens au sugerat că reacţia primară de interacţiune între receptor (canal ionic) şi acetilcolină este foarte rapidă, astfel încât complexul molecular neactivat AR (canal ionic ce interacţionează cu acetilcolina, dar nu este încă în starea 'deschis') este practic în echilibru cu moleculele de agonist (A) şi receptor (R). Considerând că moleculele de acetilcolină eliberate în spaţiul sinaptic şi care nu au interacţionat cu receptorul sunt rapid disociate în molecule inactive (vezi capitolele următoare – acetilcolina este disociată în spaţiul sinaptic de o enzimă specifică, acetilcolin-esteraza), partea de descreştere exponenţială a curentului ionic post-sinaptic reflectă tocmai închiderea complexului molecular receptor – acetilcolină activat (canal ionic în starea 'deschis'), cu constanta de reacţie α. Când canalul ionic se închide, acetilcolina se disociază de pe receptor şi este imediat disociată în molecule inactive de către acetilcolin-esterază. Dependenţa de diferenţa de potenţial transmembranar a cineticii curenţilor ionici post-sinaptici, adică a lui α, poate fi explicată în cadrul acestui model astfel: reacţia de 'închidere' a canalului ionic activat ($AR^* \rightarrow AR$, cu constanta de reacţie α) este însoţită de o redistribuire de sarcini electrice sau/şi dipoli din structura canalului ionic, care sunt localizate în interiorul membranei celulare, astfel încât diferenţe de potenţial transmembranar diferite vor afecta energetic distinct redistribuţia acestor sarcini electrice (dipoli). Acest fapt se reflectă prin dependenţa de diferenţă de potenţial a lui α iar explicaţii suplimentare despre aceste fenomene vor fi prezentate şi în capitolele următoare.

Una din primele metode de analiză cinetică utilizate pentru testarea suplimentară a modelului propus de Magleby şi Stevens a fost analiza fluctuaţiilor de curent ionic post-sinaptice induse de acetilcolină (pentru detalii referitoare la această tehnică, vezi şi capitolele următoare). În experimentele realizate de ei pe joncţiunea neuromusculară de la broască, a fost observat că, în lipsa acetilcolinei, fluctuaţiile de curent prin membrana post-sinaptică înregistrate la o diferenţă de potenţial transmembranar de –100 mV sunt foarte mici, chiar la amplificări mari ale curentului. Atunci când acetilcolina este aplicată exogen pe membrana post-sinaptică, se observă creşterea apreciabilă (până la ~ -120 nA) a curentului post-sinaptic (tip 'inward') iar observarea acestui curent la amplificări mari pune în evidenţă caracterul puternic fluctuant al acestui curent.

Interpretarea dată de către Katz şi Miledi acestor fluctuaţii de curent a fost că aplicarea exogenă a acetilcolinei produce activarea receptorilor specifici de pe membrana post-sinaptică, care trecând strochastic între cel puţin două stări

('închis' – 'deschis') provoacă corespunzător fluctuații de curent ionic. În reprezentarea următoare (Fig. 79) este arătată descompunerea în spectre de putere a acestor fluctuații de curent, înregistrate în condiții de temperatură și diferență de potențial diferite.

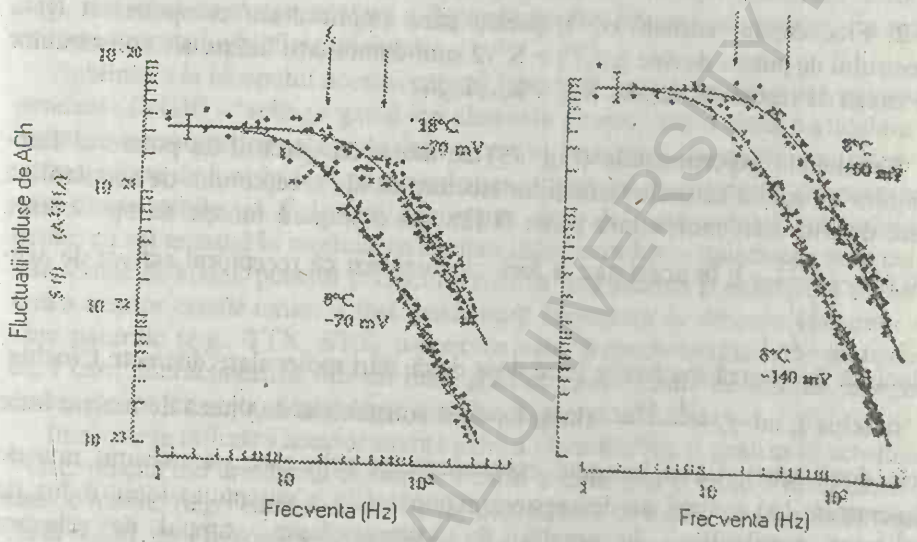


Fig. 79. Descompunerea în spectre de putere a fluctuațiilor curentului ionic generat prin receptorul nicotinic de acetilcolină activat exogenic, în condiții de temperatură diferită (8° C și 18° C) și diferență de potențial constantă (stânga)și la diferențe de potențial transmembranar diferite (-140 mV și + 60 mV) cu temperatură constantă (dreapta)

Cu toate că interpretarea în termeni de cinetică microscopică a acestor spectre de putere depășește cadrul acestei prezentări (pentru detalii suplimentare, vezi capitolele următoare), trebuie menționate două din cele mai interesante informații care pot fi extrase din acest tip de analiză:

1. Dacă se presupune ca fluctuațiile de curent ionic se datorează tranzițiilor stochastice ale canalelor ionice între k stări distincte cinetic $(a_1 \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\Leftrightarrow}} a_2 \underset{k_{-2}}{\overset{k_2}{\Leftrightarrow}} a_3 .... \underset{k_{-(k-1)}}{\overset{k_{k-1}}{\Leftrightarrow}} a_k)$, spectrul de putere al fluctuațiilor curentului

electric pot fi fitate experimental cu o sumă de (k-1) funcţii tip Lorentz $S(f) = \sum_{j=1}^{j=k-1} \frac{S^{(j)}(0)}{1+\left(\frac{f}{f_c^{(j)}}\right)^2}$.

2. Frecvenţele 'corner' ($f_c^{(j)}$), pentru care amplitudinea componentei (j) a spectrului de putere devine $S(f_c^{(j)}) = S^{(j)}/2$ sunt combinaţii liniare ale constantelor de viteză de reacţie k_1, k_{-1}, k_2, k_{-2}, ... k_{k-1}, $k_{-(k-1)}$.

Rezultatele experimentale (Fig. 79) au arătat că spectrul de putere al fluctuaţiilor de curent datorate tranziţiilor stochastice ale receptorului de acetilcolină între diferite stări moleculare poate fi fitat cu o singură funcţie de tip Lorentz ($S(f) = \frac{S(0)}{1+\left(\frac{f}{f_c}\right)^2}$); în acest caz, a fost concluzionat că receptorul activat de acetilcolină fluctuează stochastic între doar două stări moleculare distincte ('închis' – 'deschis'), iar $f_c = \frac{k_1 + k_{-1}}{2\pi}$. ($k_1$ şi k_{-1} sunt constantele de viteză de reacţie între cele două stări). Ca şi în cazul experimentelor prin care s-a măsurat rata de descreştere (α) a fazei de descreştere exponenţială a curentului ionic indus de aplicarea acetilcolinei, în condiţii de 'voltage-clamp', timpul de relaxare ($\tau = 1/(2\pi f_c)$) determinat prin analiza fluctuaţiilor de curent este dependent de temperatură, în sensul că el creşte odată cu scăderea temperaturii, precum şi de diferenţa de potenţial transmembranar, prin aceea că τ creşte odată cu hiperpolarizarea membranei. În experimentele de analiză a fluctuaţiilor de curent descrise mai sus, concentraţia acetilcolinei era destul de mică, astfel încât rata de reacţie [Ach]*k_1 (unde [Ach] semnifică valoarea concentraţiei de acetilcolină) este mult mai mică în raport cu k_{-1}; în aceste condiţii, timpul de relaxare ($\tau = 1/(2\pi f_c)$) determinat coincidea cu cel obţinut din experimentele lui Magleby şi Stevens ($\tau = 1/\alpha$ - vezi mai sus).

În acest fel, modelul iniţial propus de către Magleby şi Stevens, care descrie în termeni microscopici cinetica receptorului activat de acetilcolină, s-a dovedit a fi corect în limita capabilităţii de observaţie a instrumentelor de atunci. Metoda utilizată de către Anderson şi Stevens pentru verificarea acestui model a constituit o piatră de temelie pentru studierea proceselor de 'gating' ale canalelor ionice utilizând analiza fluctuaţiilor de curent.

BCU CLUJ UNIVERSITY LIBRARY

14.2. *Canale ionice voltaj-dependente*

Înainte de a discuta proprietățile acestor canale ionice, trebuie făcută următoarea subliniere: după cum este știut, voltul este unitatea internațională de măsură a diferenței de potențial, iar termenul 'voltaj-dependent' utilizat în această carte este originar din limba engleză; proprietatea de 'voltaj-dependență' trebuie, deci, înțeleasă ca o reprezentare a dependenței de diferență de potențial a mărimii sau procesului biofizic discutat.

Subliniam la începutul acestui capitol faptul că aceste canale ionice voltaj-dependente (VGIC - 'voltage gated ion channels') reprezintă o clasă particulară de proteine membranare integrale, care permit controlul concentrației intra- și extracelulare de ioni în funcție de valoarea diferenței de potențial transmembranară a unei celule vii. Cele mai importante clase de canale ionice voltaj-dependente, cu rol esențial în modularea excitabilității nervilor și mușchilor, sunt canalele ionice de sodiu, potasiu și calciu. Izolarea, purificarea și descrierea moleculară a acestor canale ionice a fost foarte mult favorizată de descoperirea unor toxine naturale (e.g., TTX, STX, μ-conotoxinele, batrachotoxina, grayanotoxina, etc.) care interacționează într-un înalt grad de specificitate cu diferite categorii de canale ionice voltaj dependente din clasele menționate mai sus.

Importanța utilizării acestor toxine pentru identificarea și analiza structurală a VGIC rezultă din următorul exemplu. Pentru a identifica și izola o nouă clasă de canale ionice, (e.g., canale ionice voltaj-dependente de calciu neuronale din subclasa α_{1B-d}), este nevoie în primul rând de o moleculă care să interacționeze specific cu acele canale ionice. Acest lucru poate fi vizualizat experimental (Fig. 80 – mai jos) prin aceea că, în prezența toxinei specifice în cantități nano-molare (e.g., CVID), activitatea electrică a canalelor ionice din sub-clasa α_{1B-d} este diminuată apreciabil. În figura 80 este arătată variația maximului amplitudinii curentului electric generat de aceste canale ionice în urma unei depolarizări a membranei în care ele se află, în absența și prezența a 10^{-11} și 10^{-8} CVID. După cum se observă din aceasta figură, CVID într-o concentrație de aproximativ 10 nm inhibă la aproximativ 50 % activitatea electrică a acestor canale ionice de calciu. Ținând cont și de faptul că CVID NU exercită aceeași acțiune asupra altor canale ionice, se poate afirma că această toxină este un candidat excelent pentru încercarea de izolare și purificare a canalelor ionice voltaj dependente de calciu, din clasa α_{1B-d}.

Odată ce a fost găsit 'glontele magic' care 'lovește' DOAR canalele ionice DE IZOLAT, utilizarea tehnicilor moderne de izolare proteică (e.g., cromatografie cu schimbători de ioni, lecitine-Sepharose cromatografie, centrifugarea în gradient de densitate) duce în final la izolarea și purificarea acestor proteine.

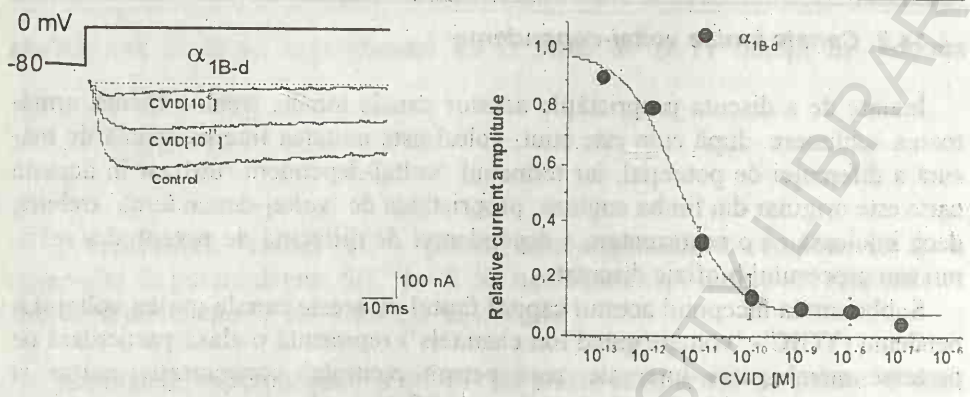


Fig. 80. Înregistrarea curentului ionic prin canale ionice voltaj-dependente de calciu neuronale din sub-clasa $\alpha_{1B\text{-}d}$ în condiţii de voltaj fixat, ce arată acţiunea inhibitoare a unei toxine specifice (notată cu CVID) asupra activităţii electrice ale acestor canale ionice. Deschiderea canalelor ionice studiate s-a realizat prin depolarizarea celulei de la –80 mV la 0 mV [*Lewis, R. J. et al, 2000. J. Biol. Chem. 275:45*]

Mai mult chiar, implementarea acestor tehnici de izolare proteică au demonstrat compoziţia proteică multimerică a canalelor ionice voltaj-dependente iar acesta a constituit un rezultat cu implicaţii deosebit de importante pentru descifrarea mecanismelor celulare de modulare a activităţii canalelor ionice. În esenţă, aceste rezultate experimentale au demonstrat faptul că pe lângă subunitatea proteică principală, ce constituie porul unui canal ionic şi care mediază procesele de permeaţie ionică selectivă, în compoziţia unui canal ionic intră şi alte domenii proteice, codate de gene diferite de cele ce sunt responsabile pentru translarea porului principal. În biofizica moleculară, accast tip de structură proteică se numeşte structură cuaternară a unui canal ionic. Deşi diversitatea biofizică semnificativă a canalelor ionice şi proprietăţile lor fundamentale de permeaţie sunt conferite de subunitatea principală a lor ce formează porul canalului ionic, este pe deplin stabilit astăzi că structura terţiară a acestei subunităţi principale precum şi proprietăţile biofizice şi farmacologice ale canalelor ionice sunt modulate apreciabil de către asocierea lor cu subunităţi auxiliare. Prin diversitatea genetică a acestor subunităţi auxiliare, interacţiunea subunitate principală – subunitate auxiliară rezultă în crearea unui potenţial imens de modulare structurală şi funcţională a unui canal ionic.

În ceea ce priveşte structura multimerică a canalelor ionice, aceasta s-a dovedit a fi o trăsătură de structură generală, având însă particularităţi de organizare cuaternară ce variază de la ţesut la ţesut; astfel, canalele ionice de sodiu din creierul mamiferelor au structură multimerică de hetero-trimer (trei subunităţi pro-

teice monomerice cu structuri diferite), formate dintr-o subunitate principală (ce conține porul canalului ionic) α (260 kDa) și altele două modulatoare β_1 (36 kDa) și β_2 (33 kDa). Canalul de sodiu din mușchiul scheletic al mamiferelor conține în structura sa cuaternară doar două subunități, de 260 kDa și 38 kDa, similare subunităților α și β_1 din canalul de sodiu existent în creier. Cea mai simplă formă de organizare structurală a canalului de sodiu este întâlnită în cazul peștilor electrici și este constituită dintr-o singură subunitate proteică de 260 kDa (α) ce formează porul canalului ionic. Cum a fost subliniat și mai sus, rezultatele experimentale au dovedit că subunitatea α constituie elementul de bază, structural și funcțional al oricărui canal ionic. În lumina ideilor deja expuse, subunitățile auxiliare, precum și cea principală, sunt glicozilate în proporție de 30 % din masa lor totală și prezența suplimentară a situsirilor de fosforilare în structura lor primară (procese mediate de protein-kinase cAMP dependente) reliefează înaltul grad de modulare a activității canalului ionic de către factori biofizici intracelulari.

În urma purificării și analizei biochimice a canalelor de calciu din mușchiul scheletic și creier, s-a dedus că și în cazul acestora avem de-a face cu un mod de organizare multimeric: subunitatea principală (α_1) ce formează porul canalului ionic de calciu are o greutate de 170-240 kDa, subunitatea α2-δ (140-170 kDa) este alcătuită din două peptide legate prin intermediul legăturilor disulfidice și se găsește 'ancorată' în membrana celulară, iar subunitatea β este în întregime citoplasmatică, având o masă moleculară cuprinsă între 52-78 kDa. În țesutul mușchiului scheletic, canalul de calciu are în componența sa multimerică și o altă subunitate – notată prin γ - compusă din patru domenii proteice transmembranare, cu capetele COO^- și NH_3^+ citoplasmatice, având greutatea moleculară de 32 kDa.

Pentru a vizualiza arhitectura de subunități a unui canal ionic, în figura următoare (Fig. 81) se ilustrează schematizat structura cuaternară a unui canal ionic de calciu, ce conține subunitatea principală, cu rol direct în procesele de permeație - α_1, și cele auxiliare, modulatoare.

Mecanismele moleculare prin care subunitățile proteice auxiliare ale unui canal ionic modulează proprietățile sale biofizice și farmacologice rămân încă în mare parte subiecte științifice deschise. Conform datelor experimentale actuale, un mod de explicare al efectelor exercitate de aceste subunități se bazează pe mecanisme de alostericitate proteică: astfel, în urma interacțiunii subunitate principală (α) – subunitate auxiliară, modificările alosterice de structură ale subunității α se reflectă modificarea proprietăților funcționale ale canalelor ionice (e.g., probabilitatea lor de deschidere, eficiența cuplajului energetic între 'gate' și aminoacizii încărcați electric ce contribuie la deschiderea canalului

ionic). Alte explicaţii plauzibile ale efectelor modulatoare ale subunităţilor auxiliare, vizibile mai ales în experimente de farmacologie, sunt cele conform cărora ele, prin mecanisme de alostericitate, alterează numărul canalelor ionice funcţionale care sunt inserate în membrana celulară.

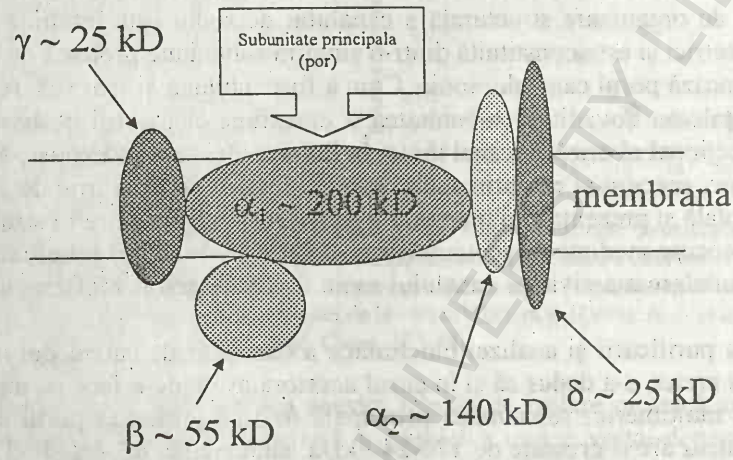


Fig. 81. Schema de structură cuaternară simplificată a unui canal ionic de calciu, ce evidenţiază subunitatea proteică principală (cu rol direct în procesele de permeaţie - α_1) şi cele auxiliare (α_2-δ, β, γ), cu rol în modularea proprietăţilor biofizice ale canalului ionic

Figura de mai jos (Fig. 82) este un exemplu de modulare a proprietăţilor biofizice şi farmacologice a unui canal de calciu neuronal de către o subunitate auxiliară (β_3).

Unul din cele mai importante obiective ale cercetării ştiinţifice fundamentale în privinţa canalelor ionice voltaj dependente a fost elucidarea structurii sale primare şi secundare.

Această tematică de studiu a fost începută încă de la măsurătorile lui Hodgkin şi Huxley (vezi capitolele anterioare) şi continuate cu experimente de biofizică modernă, implicând tehnica 'patch-clamp' şi tehnici de biologie moleculară. Deşi astăzi este cunoscută structura primară integrală a acestor canale ionice, nu avem încă informaţii despre structura şi arhitectura tridimensională a canalelor ionice, toate cunoştinţele în acest sens fiind derivate din studii de RMN. În figura 83 se arată o foarte bună reprezentare intuitivă, aşa cum a fost sugerată de experimentele de biofizică, farmacologie şi biologie moleculară, a organizării terţiare a unui canal ionic voltaj-dependent. Clonarea VGIC a început încă din anii '80, şi una din cele mai interesante concluzii a fost că aceste canale ionice

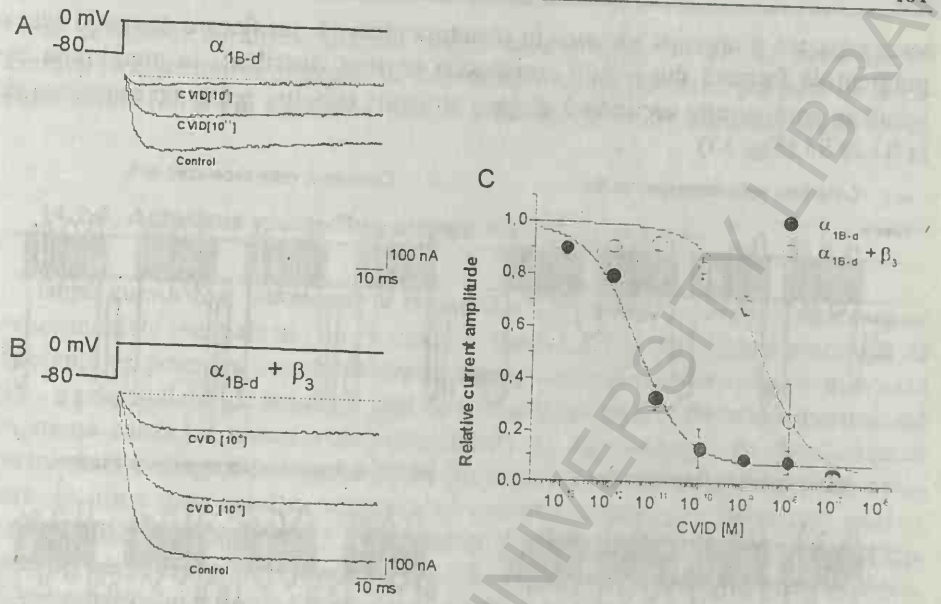


Fig. 82. Date experimentale ce exemplifică procesul de modulare a proprietăților biofizice și farmacologice a unui canal de calciu neuronal de către o subunitate auxiliară (β_3). Reprezentările (A) și (B) conțin informații atât despre efectele modulatoare ale subunității β_3 asupra proprietăților de permeație prin porul principal (α_{1B-d} - de notat creșterea semnificativă a curentului electric prin canalul ionic în prezența subunității modulatoare β_3), cât și asupra proprietăților farmacologice ale acestui canal ionic (de observat modificarea în sens pozitiv a concentrației de CVID necesară pentru a obține 50 % inhibiție a curentului electric prin canalul ionic atunci când subunitatea modulatoare β_3 este prezentă. În figura (C) este reprezentat comprehensiv efectul de modificare al farmacologiei canalului ionic studiat la interacțiunea cu toxina CVID, în prezența subunității modulatoare β_3 *[Luchian, T. et al, 1999. Proceedings of the Australian Physiological and Pharmacological Society 30(2)]*

voltaj dependente de sodiu, potasiu și calciu aparțin aceleiași superfamilii genetice, având aceeași structură secundară de bază (aceste afirmații se referă în special la subunitatea de bază - α - a VGIC). Astfel, experimentele de clonare genetică efectuate în laboratorul lui S. Numa au arătat că VGIC de sodiu și calciu (mai precis, subunitățile lor centrale α) sunt polipeptide foarte mari (> 2000 aminoacizi), ce conțin patru domenii identice (notate I, II, III, IV) alcătuite din șase α-helix-uri transmembranare (notate de la S1 la S6). Alte experimente realizate în laboratoarele lui Y. N. Jan și O. Pongs (1987 – 1988), au dovedit că VGIC de potasiu (subunitatea sa centrală α, ce-i conferă proprietățile caracteristice de permeație și selectivitate) are structura tetramerică, conținând patru domenii pro-

BUCHAREST UNIVERSITY LIBRARY

teice separate şi aproape identice în structura primară, iar fiecare domeniu este o polipeptidă formată din ~ 600 aminoacizi ce sunt distribuiţi în membrana celulară în configuraţie secundară de şase structuri α-helix, notaţi de asemenea de la S1 la S6 (Fig. 83).

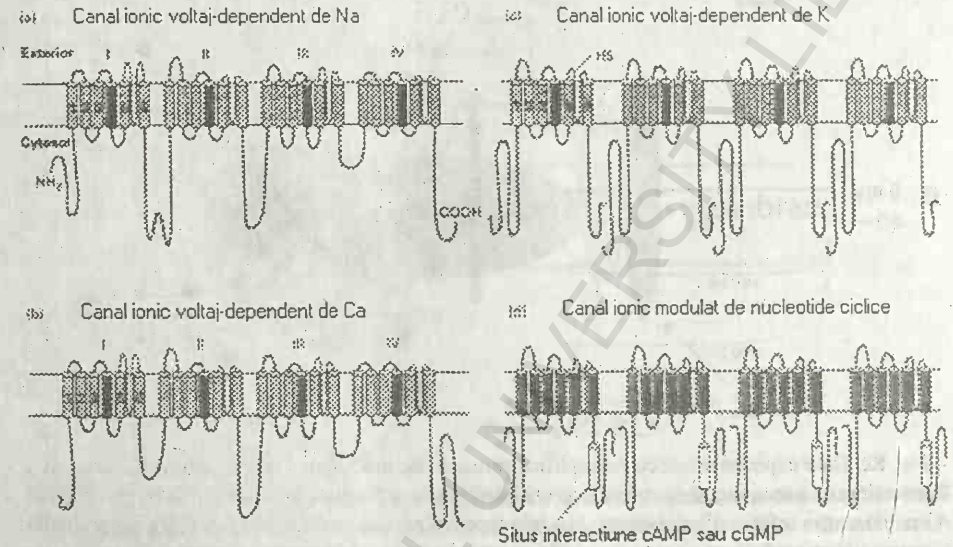


Fig. 83. Reprezentări structurale simplificate ale proteinelor ce constituie porul principal (permeant) al canalelor ionice voltaj-dependente de sodiu (A), calciu (B), potasiu (C) şi al canalului ionic modulat de nucleotideciclice (cAMP sau sGMP) (D)
[după *Luchian, T. 1997, Ph. D Thesis, Graz*]

Datorită asemănărilor structurale şi funcţionale ale VGIC, mă voi referi în cele ce urmează la canalul ionic de potasiu voltaj-dependent, pentru a surprinde câteva din cele mai importante caracteristici şi trăsături de organizare moleculară, cu rol esenţial în funcţia lor; mecanismele şi structurile proteice implicate în activarea VGIC de potasiu, 'gating' şi inactivarea sa sunt practic identice pentru toate VGIC.

Astfel, cele mai relevante domenii proteice pentru funcţia VGIC de potasiu sunt:

a. domeniul α-helix S4 (Fig. 83), care contribuie la detecţia variaţiilor de diferenţă de potenţial în membrana celulară;

b. segmenul peptidic H5 (denumit uneori şi P – Fig. 83), cu rol esenţial în formarea porului hidrofil al canalului ionic;

c. domeniul de aminoacizi ce unește α-helix-urile S4-S5, ce joacă un rol esențial în constituirea situsului de interacțiune cu un domeniu peptidic de la capătul amino (NH_3^+) al canalului ionic în procesul de inactivare al canalului ionic.

14.2.1. *Activarea voltaj-dependență a VGIC de potasiu*

După cum a fost menționat și în capitolele precedente, una din observațiile experimentale esențiale ale lui Hodgkin și Huxley a fost dependența puternică de diferență de potențial transmembranar a generării influxurilor celulare nervoase (i.e., a potențialelor de acțiune), fapt ce a sugerat și ulterior dovedit experimental existența canalelor ionice voltaj-dependente ce sunt activate de depolarizarea membranei biologice și inițiază astfel propagarea potențialelor de acțiune celulare. În urma unor selecții riguroase a tuturor mecanismelor fizice care puteau constitui baza de explicație a fenomenelor experimentale observate, singura explicație acceptată a fost aceea că modificările valorii câmpului electric intermembranar celular produc deplasarea conformațională a unor aminoacizi încărcați electric sau domenii de aminoacizi încărcate electric din structura canalelor ionice. Cu alte cuvinte, aceste domenii de aminoacizi funcționează ca niște senzori de diferențe de potențial transmembranar, detectând și apoi transmițând în toată structura canalului ionic modificările survenite în diferența de potențial transmembranar. Mai mult, având în vedere că cea mai mare parte a diferenței de potențial transmembranar este localizată în interiorul miezului hidrofob al biomembranei, acel domeniu peptidic cu rol de senzor al modificărilor diferențelor de potențial transmembranare s-a presupus a fi localizat topologic în interiorul membranei celulare. Însă după cum Hodgkin și Huxley au sugerat, un astfel de scenariu fizic ar presupune existența curenților electrici de 'gating', care sunt asociați cu deplasările spațiale ale acestor senzori și care ar trebui să preceadă curenții ionici în membranele celulare excitabile. Într-adevar, în condiții experimentale în care curenții ionici (care sunt mari în magnitudine - ~ μA-, și deci ar estompa complet vizualizarea curenților de 'gating' – nA) sunt aboliți în prezența unor toxine specifice ce blochează fluxul ionic prin canalele ionice respective. Pentru canalul de potasiu, aceasta se obține prin adăugarea în mediul extracelular a 2 μm charybotoxin; în aceste condiții experimentale, curenții de 'gating' ce iau naștere ca urmare a deplasării senzorilor electrici ai canalelor ionice de potasiu în urma unei depolarizări a membranei celulare au putut fi observați cu ușurință (Fig. 84).

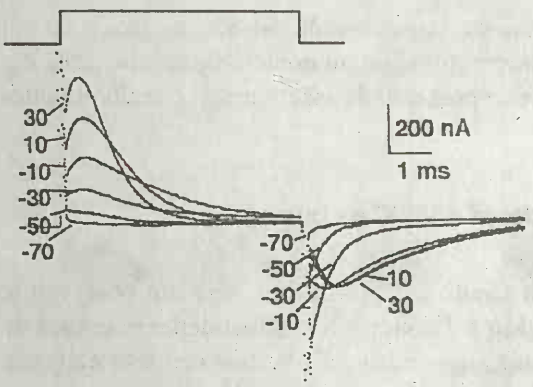


Fig. 84.

Înregistrări ale curenților electrici tip *'gating'* pentru un canal de potasiu voltaj-dependent, asociați cu activarea sa (când diferența de potențial transmembranară este modificată tip' treaptă' de la potențialul de repaus la valori cuprinse între –70 mV și + 30 mV) [*Armstrong C. M. and B. Hille 1998. Neuron 20*]

Pentru a explica forma multi-exponențială a curenților electrici tip 'gating', voi anticipa unele noțiuni teoretice ce vor fi prezentate detaliat în cuprinsul acestui capitol.

Considerând că tranzițiile moleculare ale canalului ionic ce preced deschiderea sa au loc între 'n' stări conformaționale moleculare discrete, curentul tip 'gating' reflectă tocmai mișcarea sarcinilor electrice asociate cu aceste tranziții. Mai jos, este prezentată o posibilă schemă molecular de reacție a tranzițiilor moleculare ce preced deschiderea unui canal ionic ce au loc între 'n-1' stări 'închis' (C) și o stare 'deschis' (O).

$$C_1 \Leftrightarrow C_2 \Leftrightarrow ....C_i... \Leftrightarrow C_{n-1} \Leftrightarrow O \qquad (14.6)$$

Notând cu $p_i(t)$ probabilitatea ca acest canal ionic să se afle în starea moleculară 'i' și cu k_{ij} rata de tranziție a canalului ionic între stările 'i' și 'j' , evoluția temporală a cantităților $p_i(t)$ este dată în formă matricială de ecuația diferențială a lui Kolmogorov - vezi capitolul *'Principii de interpretare stochastică a semnalelor electrice de tip 'patch-clamp'*):

$$\frac{dP(t)}{dt} = P(t)Q \qquad (14.7)$$

Soluția acestei ecuații matriciale este dată de:

$$P(t) = \sum_{i=1}^{n} A_i e^{\lambda_i t} \qquad (14.8)$$

iar expresia generală a evoluției temporale a curentului electric ce apare la tranziția canalului ionic între cele (n-1) stări 'închis' (C) și starea 'deschis' (O) (vezi schema cinetică de mai sus) este reliefată de:

$$I(t) = N(V - V_{Nerst})(\sigma_1 p_1(t) + \sigma_2 p_2(t) + \sigma_3 p_3(t) + ...\sigma_n p_n(t)) \qquad (14.9)$$

– σ_i este conductivitatea electrică a stării moleculare discrete 'i' (vezi capitolul *'Principii de interpretare stochastică a semnalelor electrice de tip 'patch-clamp'*)

Evident, în cazul schemei moleculare de mai sus, doar σ_n (conductivitatea electrică a stării deschis 'O' este diferită de zero). Valoarea integralei curentului electric I(t) (de tip 'gating' în acest caz) este numeric egală cu sarcina electrică totală care este asociată tranzițiilor moleculare între cele 'n' stări discrete.

În cazul canalului ionic voltaj dependent de potasiu, experimente de tip 'patch-clamp' au relevat că sarcina electrică totală responsabilă pentru evoluția temporală a curentului de 'gating' observat este de 8 e_0, unde prin e_0 am desemnat sarcina electrică a unui electron.

Următorul pas în elucidarea mecanismului procesului de activare voltaj-dependență a canalelor de potasiu a fost stabilirea unei scheme cinetice de reacție, care să explice atât diferența de timp între depolarizarea celulei cât și activarea curenților ionici mediați de canalele ionice de potasiu (~ 600 μs, pentru o depolarizare a biomembranei de la –80 mV la 20 mV). Unul dintre cele mai elaborate modele cinetice ce abordează cu succes acest detaliu, cât și reflectarea cu acuratețe a mecanismelor de activare așa cum au fost observate în experimente de înregistrare a curenților ionici, de 'gating' și de tip 'single-channel' a fost propus de W. N. Zagotta (vezi mai jos).

În modelul propus de el, Zagotta a presupus că fiecare din cei patru monomeri ce constituie subunitatea principală a canalului ionic de potasiu voltaj-dependent suferă modificări identice de conformație în timpul depolarizării membranei celulare, trecând prin două stări moleculare 'nepermisive' până când ajunge într-o stare moleculară 'permisivă': el a sugerat că este necesar ca toate subunitățile monomerice să fie în starea 'permisivă' pentru ca acest canal ionic să se deschidă și să devină deci permeant pentru ionii de potasiu. Ratele de tranziție între diferite stări moleculare ('permisive' și 'nepermisive') pentru fiecare monomer sunt voltaj-dependente, iar sarcina electrică totală asimilată cu modificările de conformație ale unui monomer este de 1.85 e_0 pentru tranziții între stări 'nepermisive' și 1.42 e_0 între ultima stare 'nepermisivă' și starea moleculară 'permisivă' (Fig. 85).

În mod natural, odată identificată schema de reacție cinetică ce ar putea explica procesul de 'gating' al canalelor de potasiu, următorul pas a fost de identificare exactă a domeniului proteic, încărcat electric net sau cu caracter dipolar, responsabil pentru curenții de 'gating' observați și care reprezintă în fapt senzorul de variație a diferențelor de potențial transmembranare.

În urma unor numeroase experimente de mutageneză și electrofiziologie, cel mai probabil domeniu proteic cu această funcție a fost considerat α-helix-ul S4, care conține reziduuri de aminoacizi bazice (arginină sau lizină) în fiecare a treia poziție din structura primară (Fig. 86).

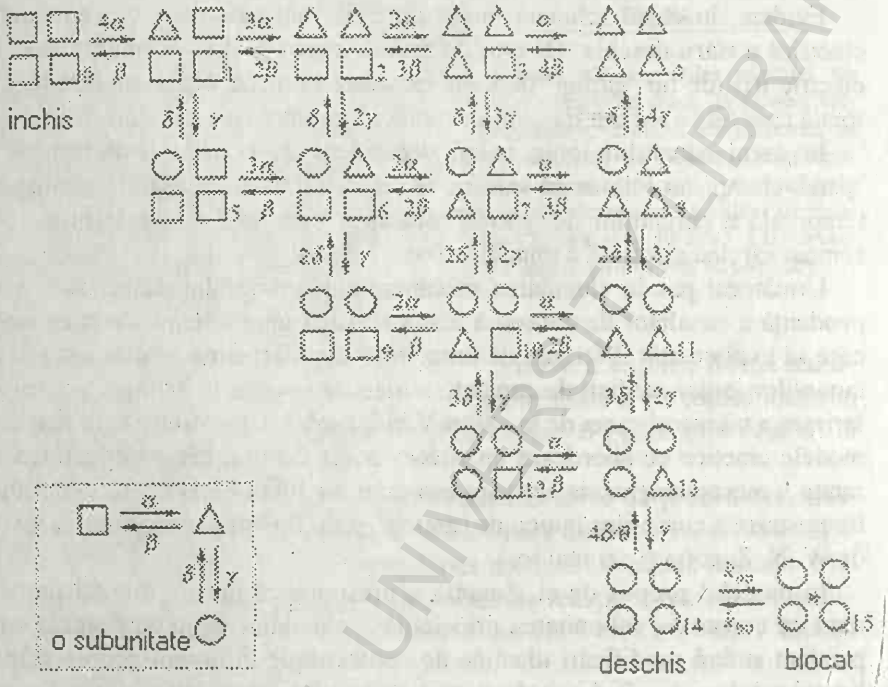


Fig. 85. Modelul cinetic al activării voltaj-dependente a unui canal de potasiu specific (*Shaker*), în viziunea lui Zagotta et al. [*Zagotta, W. N. and R. W. Aldrich 1990. J. Gen. Physiol. 95*]

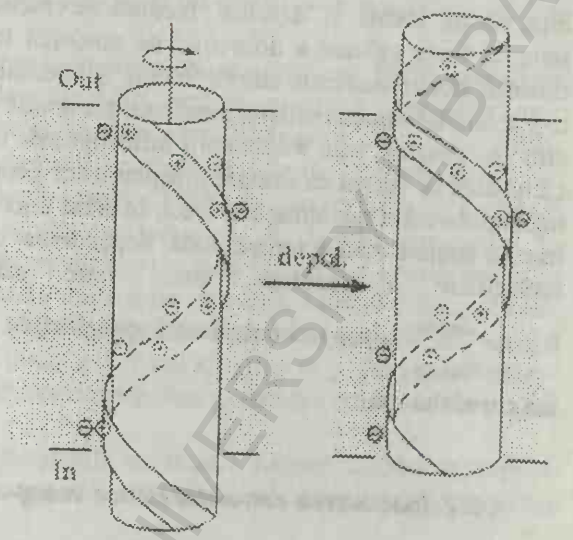
Shaker	L A I L R V I R L V R V F R I F K L S R H S K G L Q
Na (I)	V S A L R T F R V L R A L K T I S V I P G L K T I V
Ca (I)	V K A L R A F R V L R P L R L V S G V P S L Q V V L
Na (II)	L S V L R S F R L L R V F K L A K S W P T L N M L I
Ca (II)	I S V L R C I R L L R L F K I T K Y W T S L S N L V
Na (III)	L G A I K S L R T L R A L R P L R A L S R F E G M R
Ca (III)	I S V V K I L R V L R V L R P L R A I N R A K G L K
Na (IV)	P T L F R V I R L A R I G R I L R L I K G A K G I R
Ca (IV)	E S A R I S S A F F R L F R V M R L I K L L S R A E

Fig. 86. Comparaţie între secvenţele proteice primare ale domeniilor S4 din canalele ionice voltaj-dependente de sodiu, calciu şi potasiu (*Shaker*). De remarcat prezenţa consistentă în aceste structuri a reziduurilor de aminoacizi bazici (arginina –R- sau lizina –K-) în fiecare a treia poziţie din structurile primare prezentate, fapt ce sugerează un mecanism molecular comun de activare voltaj-dependentă a acestor canale ionice

BCU CLUJ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Fig. 87

Reprezentarea modelului 'helix alunecător' (α–helix-ul S4) de explicare a mecanismului voltaj-dependent de activare a unor canale ionice, în prezența unei depolarizări membranare ('*depol*') [*Catterall, A. W. 1988. Science 242*]



Printre alte posibile modele explicative, cea mai acceptată modalitate de explicare a mișcării efectuate de domeniul S4 sub influența modificărilor în diferența de potențial transmembranar este bazată pe modelul 'helix-ului alunecător' (Fig. 87).

În esență, ideea acestui model este următoarea: la diferențe de potențial transmembranare de repaus, negative în citosol, aminoacizii bazici ce sunt încărcați electric pozitiv și localizați pe domeniul S4 sunt menținuți în stare de echilibru metastabil în miezul hidrofob al biomembranei, prin intermediul interacțiunii lor electrostatice cu aminoacizi acidici (E283 și E293 de pe domeniul S2 și D316 de pe domeniul S3). În urma depolarizării locale a membranei celulare, aceste resturi de pe domeniul S4 părăsesc starea de echilibru metastabil, mișcându-se spre partea extracelulară a biomembranei: domeniul S4 se presupune a executa o mișcare spiralată, rotindu-se cu aproximativ 60° și translându-se în același timp cu aproape 5-20 Å. Așadar, domeniile de aminoacizi S4 pot fi asimilate cu senzori moleculari sensibili la modificări de diferență de potențial transmembranară: aceste mișcări secvențiale au loc în toți cei patru monomeri ai subunității principale a canalului ionic, conducând de-ocluzia 'porții' canalului ionic în final la deschiderea canalului ionic. 'Poarta' canalului ionic, ce menține canalul ionic în starea moleculară 'închis' în absența depolarizării membranare, se consideră a fi formată din domeniul peptidic (13 aminoacizi) intracelular ce unește domeniile S4 și S5, de pe cei patru monomeri ce formează subunitatea principală a canalului ionic. Din punct de vedere al cineticii moleculare, este foarte important de făcut distincție între procesele moleculare ce corespund modificărilor de structură terțiară ale unui canal ionic voltaj-dependent în urma modificărilor de potențial transmembranar, mediate de senzorii moleculari S4, și tranzițiile canalului ionic

între stările 'închis' şi 'deschis', mediate de cinetica 'porții' canalului ionic. Teoretic, la orice valoare a diferenței de potențial transmembranar se pot observa tranziții stochastice între stările 'închis' şi 'deschis'; însă pentru marea majoritate a canalelor ionice voltaj-dependente, tranzițiile canalului ionic între stările 'închis' şi 'deschis' sunt foarte mult influențate de modificările de structură proteică terțiară ce survin ca urmare a deplasărilor geometrice a domeniilor S4, în urma depolarizării membranare. Deci, în urma unei depolarizări a membranei celulare ce conține canale ionice voltaj dependente, constanta de echilibru a reacției moleculare a canalului ionic între stările 'închis' şi 'deschis' ($'inchis' \underset{k_{inchis}}{\overset{k_{deschis}}{\Leftrightarrow}} 'deschis'$) este deplasată spre dreapta, favorizându-se astfel deschiderea canalului ionic.

14.2.2. *Inactivarea canalelor ionice voltaj-dependente*

Inactivarea canalelor ionice voltaj-dependente reprezintă un proces cinetic distinct față de activarea voltaj-dependentă, şi care corespunde unei stări moleculare a canalului ionic distinctă în comparație cu starea sa 'închis' sau 'deschis'.

Astfel, după activare şi cuplată cu aceasta, canalele ionice voltaj-dependente intră într-o stare ne-conductivă, **diferită molecular** de starea sa 'închis' ce este evidențiată mai ales în lipsa depolarizării membranare, şi care se presupune a fi indentică din punct de vedere a structurii terțiare cu starea de desensitivizare a canalelor ionice ligand-dependente (vezi mai sus). În cazul membranelor biologice excitabile, starea de inactivare a VGIC de sodiu implică menținerea biomembranei într-o stare fizică depolarizată (în care diferența de potențial transmembranar este mult mai mare (~ 10 mV) față de potențialul de repaus (~ -80 mV), şi deci în imposibilitatea de a genera un nou potențial de acțiune. Altfel spus, dacă printr-un mijloc oarecare (biochimic sau fizic) am face ca tranziția VGIC de sodiu în starea inactivă să fie ireversibilă, aceasta ar provoca întreruperea comunicării celulare prin respectiva biomembrană. Experimente de electrofiziologie tip 'single channel', efectuate pe celule ce exprimă ARN exogen al canalului de potasiu voltaj-dependent (tip *Shaker*), au demonstrat cvasi-lipsa dependenței de diferența de potențial transmembranar a procesului de inactivare; acest fapt sugerează că spre deosebire de procesul de activare, inactivarea VGIC nu presupune deplasarea unor sarcini electrice în interiorul biomembranei, sau chiar dacă acel domeniu proteic responsabil pentru inactivare posedă sarcini

electrice sau dipoli electrici, în mișcarea sa, el nu pătrunde în miezul hidrofob al biomembranei.

Din punct de vedere microscopic, procesul de inactivare al VGIC presupune două tipuri de tranziții moleculare ale VGIC activat, cu rate de reacție diferite. Aceste procese cinetice distincte au fost denumite 'inactivare rapidă' și 'inactivare lentă'. Experimente de mutageneză cuplate cu cele de electrofiziologie au demonstrat că procesul de inactivare rapidă a VGIC de potasiu dispare, dacă mediul citoplasmatic celular este supus unui tratament de digestie enzimatică cu protease; aceasta a sugerat că este posibil ca un domeniu proteic citoplasmatic al VGIC de potasiu să fie implicat în inactivarea rapidă a canalului ionic. Suplimentar, s-a stabilit că în cazul VGIC de potasiu tratate cu protease, expunerea părții citoplasmatice a canalului ionic la blocanți specifici (e.g., tetraetilamoniu – TEA) produce reapariția unui proces cinetic, foarte similar cu cel de inactivare rapidă.

Aceste rezultate coroborate au stabilit un model elegant capabil să explice procesul de inactivare rapidă, cunoscut în literatură sub denumirea de modelul 'ball-and-chain'.

În conformitate cu acest model, un domeniu citoplasmatic al VGIC de potasiu ('ball'), legat de canalul ionic printr-o peptidă ('chain') se mișcă (difuzează) în mediul citoplasmatic și imediat ce găsește canalul ionic într-o stare moleculară adecvată (i.e., în starea 'deschis') interacționează cu acesta și-l inactivează.

Experimente sistematice de mutații genetice punctuale au arătat că primii 42 de aminoacizi de la capătul amino al VGIC de potasiu (tip '*Shaker*') sunt direct implicați în acest proces de inactivare (ei ar constitui acel 'ball'); această concluzie a fost stabilită în urma observației că VGIC de potasiu nu s-a mai inactivat în urma eliminării genetice din structura primară a acestui canal ionic a celor 42 aminoacizi. Mai mult chiar, atunci când o peptidă sintetică ('*synthetic peptide*') care conține primii 20 din cei 42 aminoacizi se aplică exogen în mediul citoplasmatic al canalului ionic mutant genetic ('*mutant shaker K^+ channel*' - cum s-a arătat mai sus), procesul de inactivare se restabilește (Fig. 88).

O altă întrebare ce se pune în legătură cu procesul de inactivare rapidă al VGIC, modelat 'ball and chain', este legată de localizarea situsului de pe proteină, unde domeniul citoplasmatic al canalului ionic cu rol de 'ball' se leagă și produce starea moleculară inactivă. Tot prin intermediul experimentelor de mutageneză cuplate cu cele de electrofiziologie moleculară, s-a stabilit că în cazul canalului de potasiu voltaj-dependent, domeniul aminoacidic (5 aminoacizi) ce leagă helix-urile S4 și S5 constituie acest situs de interacțiune pentru peptida de inactivare 'ball'). Deoarece mutații genetice în acest receptor conduc și la alterarea conductanței canalelor ionice (VGIC) individuale fără să modifice dis-

tribuția superficială de sarcina electrică citoplasmatică, a fost concluzionat că receptorul constituit din cei 5 aminoacizi pentru peptida inactivatoare este așezat spațial în vecinătatea porului canalului ionic.

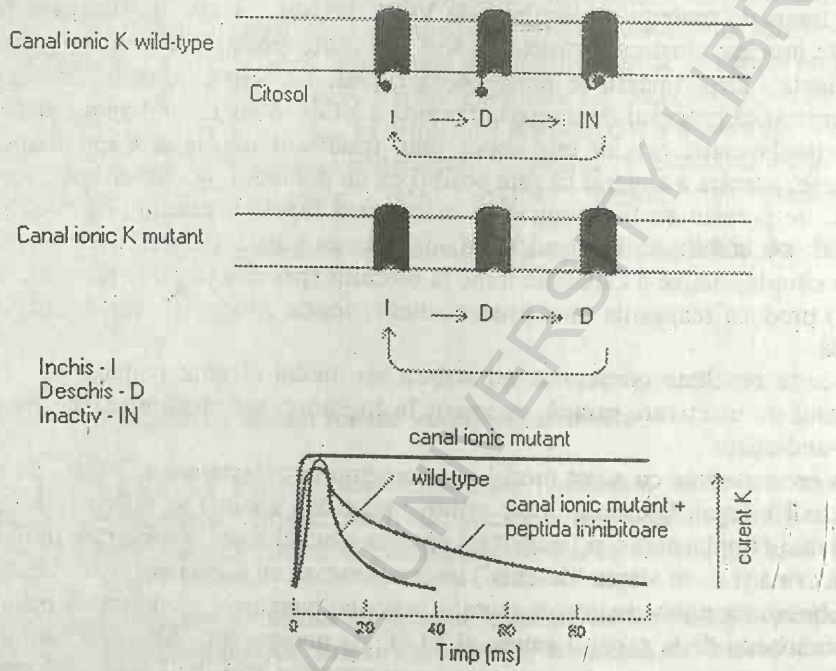


Figura 88. Reprezentarea sumarizată a experimentului ce susține ipoteza '*ball-and-chain*' de inactivare a canalului de potasiu voltaj-dependent (vezi text). Prin '*inchis*', '*deschis*' și '*inactiv*' sunt desemnate cele trei stări moleculare disctincte ale canalului ionic studiat: starea de repaus, inactivă, starea activată (canal ionic deschis) și starea deschis, dar inactivată.

Figura următoare (Fig. 89) vizualizează sugestiv modelul 'ball and chain' de inactivare rapidă a VGIC.

În ceea ce privește procesul lent de inactivare al VGIC, ideea actuală este că în cursul acestui proces, VGIC intră într-o stare moleculară mult mai stabilă decât cea implicată în inactivarea rapidă; tranziția spre această stare se face liniar, din starea moleculară corespunzătoare inactivării rapide.

Trebuie menționat că procesul de inactivare al canalelor ionice voltaj-dependente devine reversibil, **doar dacă** biomembrana este repolarizată la o valoare a diferenței de potențial comparabilă cu potențialul celular de repaus. În cazul pro-

BCU CLUJ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

ceselor de propagare a potențialelor de acțiune în membrana excitabilă, acest proces de repolarizare membranară, și deci de aducere a membranei în starea fizică în care un nou potențial de acțiune poate fi generat, este mediat de canalele de potasiu voltaj-dependente. Când biomembrana este repolarizată la tensiuni de ~ -80 mV, deplasarea spațială reversată a segmentelor S4 ce sunt responsabile pentru deschiderea VGIC de sodiu, produce alosteric modificări de structură ale acestor canale ionice, și acestea pot tranziționa favorabil energetic în starea 'închis'; în această stare, tot prin intermediul modificărilor de structură de tip alosteric, receptorul pentru domeniul 'ball' de inactivare își pierde afinitatea pentru peptida inactivatoare ('ball'), și deci canalul ionic realizează tranziția între stările 'inactiv' – 'închis'.

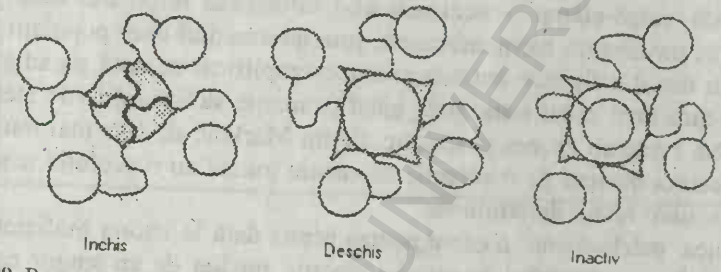


Fig. 89. Reprezentarea pictorială a modelului 'ball-and-chain' de inactivare a canalului de potasiu voltaj-dependent. În urma unei depolarizări membranare, canalul ionic trece din starea 'închis' în starea 'deschis'; în această conformație moleculară, oricare din cele patru domenii proteice inactivatoare ('*ball*') poate interacționa molecular cu un receptor specific (vezi text - proces mediat de difuzia moleculară a domeniului inactivator spre situsul de interacțiune specific) și cauzează inactivarea canalului ionic. În cazul canalelor voltaj-dependente de sodiu, acest mecanism de inactivare este asemănător, cu excepția faptului că în structura proteinei există o singură asemenea structură '*ball*']

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

15. Tehnica 'patch-clamp' de studiere a canalelor ionice

În anul 1976, savanții germani E. Neher și B. Sackmann au dezvoltat o tehnică care a revoluționat cercetarea științifică fundamentală și aplicată din biofizica moleculară și celulară: tehnica 'patch-clamp'. După cum prezentam și la începutul acestui capitol, experimentele de electrofiziologie celulară (în special de măsurare a curenților electrici transmembranari mediați de canalele ionice, cu ajutorul tehnicii 'patch-clamp' – vezi mai sus) furnizează informații despre curenții electrici ce traversează biomembranele, prin intermediul unor populații de canale ionice. În una din figurile anterioare am exemplificat această paradigmă: chiar dacă cinetica unui canal ionic individual (tranziția sa între diferite stări 'închis' și 'deschis') este un proces stochastic, de tip Markov, de cele mai multe ori curenții electrici mediați de o colecție de canale ionice au o evoluție temporală ce se supune unor relații deterministe.

Tehnica 'patch-clamp' a oferit pentru prima dată în istoria biofizicii moleculare posibilitatea măsurării curentului electric mediat de un singur canal ionic, deschizându-se astfel noi perspective practice de a caracteriza procesele de permeație și 'gating' ale canalelor ionice. Pentru a oferi un exemplu foarte simplu, care surprinde în același timp o mică parte din potențialul tehnicii 'patch-clamp', să considerăm următorul experiment: într-o determinare experimentală, în urma activării unei colecții de canale ionice (e.g., în prezența unui agonist specific, acetilcolina) și în prezența unei toxine specifice, se observă diminuarea dramatică a amplitudinii curentului electric mediat de acele canale ionice (Fig. 90) în comparație cu cazul în care toxina era absentă.

Presupunând că acele canale ionice în număr de N, și fiecare având conductivitatea electrică σ funcționează independent, putem scrie următoarea relație pentru valoarea curentului electric măsurat în absența toxinei:

$$I_{ionic}(t) = NP_{open}(t)\sigma\left(V_{aplicat} - V_{Nernst}\right) \qquad (15.1)$$

unde:

$I_{ionic}(t)$ – curentul macroscopic înregistrat

$P_{open}(t)$ – probabilitatea ca un singur canal ionic să fie în starea deschis

$V_{aplicat}$ – diferența de potențial aplicată din exterior asupra canalului ionic

V_{Nernst} – potențialul Nernstian al canalului ionic respectiv

BCU IASI / BIBLIOTECA CENTRALA UNIVERSITARA / LIBRARY

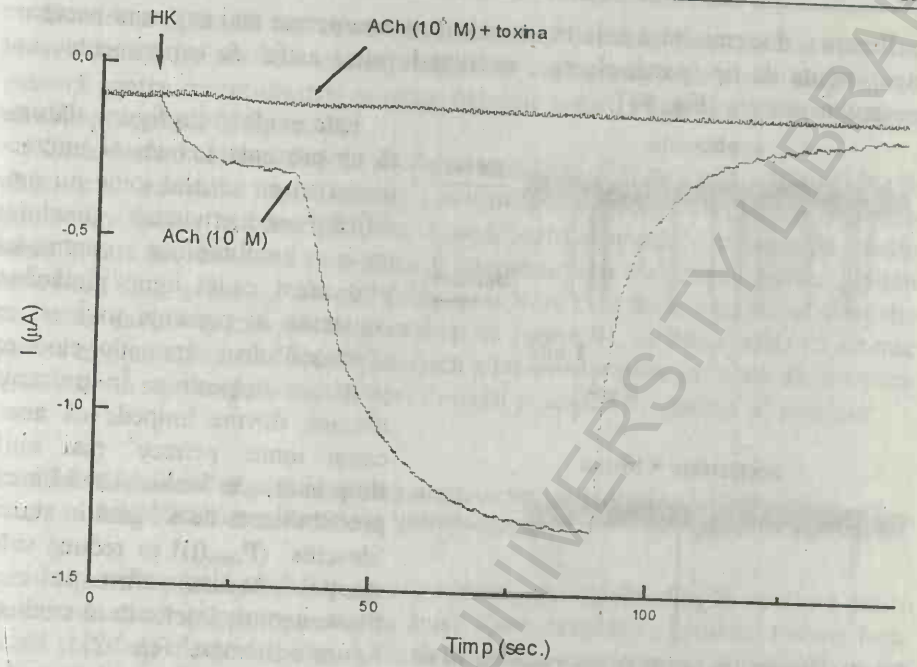


Fig. 90. Modificarea amplitudinii curentului ionic mediat de o colecție de receptori muscarinici de acetilcolină, activați de interacțiunea cu acetilcolina prin intermediul unei proteine G (vezi capitolele următoare), sub influența unei toxine specifice (DS6). HK este notația utilizata pentru o soluție fiziologică specială ('high potassium'), utilizată în mediul extracelular pentru a mări conductanța canalelor ionice studiate. *[Luchian, T. 1997. Ph. D. Thesis, Graz]*

Diminuarea curentului macroscopic în prezența toxinei poate fi interpretată în trei moduri, care NU sunt discernabile prin asemenea măsurători macroscopice:

a. fie în prezența toxinei probabilitatea de a găsi un canal ionic în starea 'deschis' ($P_{open}(t)$) este mult redusă, în comparație cu situația în care toxina este absentă;

b. fie în prezența toxinei $P_{open}(t)$ rămâne neschimbată, însă conductivitatea electrică a unui singur canal ionic se modifică (micșorează) dramatic;

c. ambele situații (a și b) au loc simultan.

În cazul (a), spunem că toxina exercită efecte de modificare a cineticii ('gating'-ului) canalelor ionice, iar în cazul (b) apreciem că toxina modifică doar proprietățile de permeație ale canalului ionic.

BCU CLUJ / CETATE UNIVERSITY LIBRARY

Pentru a discerne între cele trei mecanisme enumerate mai sus, sunt necesare experimente de tip 'patch-clamp'; rezultatele unor astfel de experimente sunt prezentate mai jos (Fig. 91):

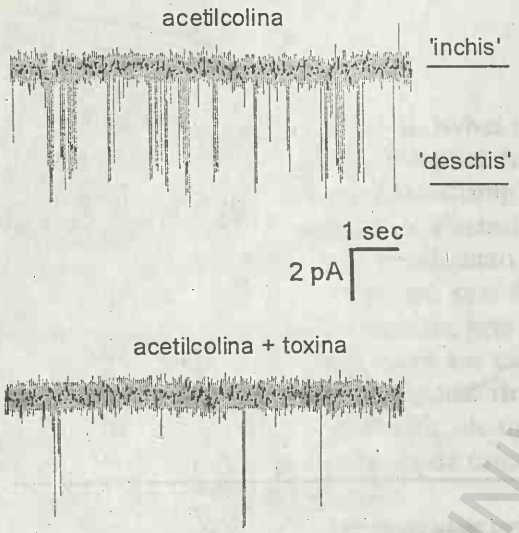
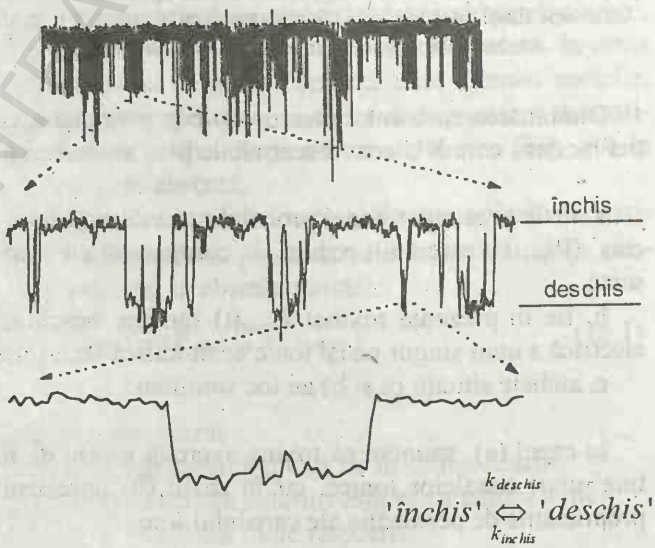


Fig. 91. Înregistrarea curentului electric mediat *de un singur* receptor de acetilcolină muscarinic în absența, respectiv prezența toxinei specifice DS6 [*Luchian, T. 1997. Ph. D. Thesis, Graz*]

Este evident din figura alăturată că prezența toxinei și interacțiunea sa cu canalul ionic nu modifică conductivitatea canalului ionic, amplitudinea curentului prin acest canal ionic rămânând constantă în prezența toxinei; ea afectează doar dramatic cinetica proteinei respective. În prezența toxinei, devine limpede că acest canal ionic 'petrece' mai mult timp în starea 'închis', astfel încât probabilitatea de a-l găsi în starea 'deschis' ($P_{open}(t)$) se reduce substanțial. Această afirmație este foarte ușor de înțeles dacă studiem figura următoare (Fig. 92):

Fig. 92.

Asimilarea a cel puțin două (stările 'închis' și 'deschis') din conformațiile moleculare distincte ale receptorului muscarinic de acetilcolină cu reprezentarea curentului ionic mediat de acest canal ionic. În starea 'închis', curentul ionic mediat de proteină este nul; în starea 'deschis' el are valoare finită, diferită de zero (reprezentat ca o deflexie a semnalului înregistrat în sens negativ) (*Tudor Luchian, rezultate nepublicate*)



Deoarece figura de mai sus are mai ales scop ilustrativ (s-au utilizat scări succesive de mărire ale semnalului), s-a evitat adăugarea unei scale singulare de măsură pentru curent electric şi timp; canalele ionice studiate sunt însă aceleaşi ca cele prezentate în figura 91.

Considerând cel mai simplu model cinetic (Fig. 92) ce descrie tranziţiile stochastice ale canalului ionic ('gating') în urma activării sale (i.e., reacţii între doar două stări 'închis' şi 'deschis'), orice modificare a timpilor petrecuţi de canalul ionic în una din cele două stări poate fi interpretată ca o alterare a ratelor de tranziţie (i.e., $k_{închis}$ şi $k_{deschis}$) ale canalului ionic între cele două stări moleculare distincte. În cazul experimentului prezentat de figura 91, se poate arăta că interacţiunea toxinei cu canalul ionic provoacă alterarea timpilor de viaţă ale proteinei în cele două stări moleculare, şi deci implicit procesul de 'gating' al acesteia.

15.1. *Elemente şi principii de construcţie utilizate în realizarea amplificatoarelor de tip 'patch-clamp'*

Ideea conceptuală a tehnicii 'patch-clamp' este relativ simplă: pentru a măsura curenţii electrici printr-un singur canal ionic, respectiva proteină trebuie localizată şi izolată electric de restul canalelor ionice membranare, realizându-se astfel posibilitatea înregistrării doar a curenţilor electrici mediaţi de canalul ionic astfel izolat (Fig. 93).

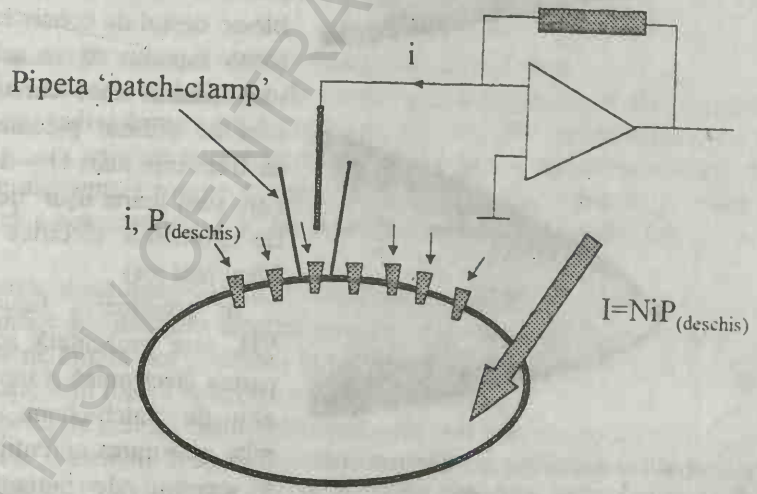


Fig. 93. Reprezentarea de principiu a metodei de măsurare a curenţilor electrici mediaţi de un singur canal ionic (*'patch-clamp'*)

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

În figura 93 este schematizată procedura de izolare a canalelor ionice membranare: în principiu, o pipetă specială de sticlă (pipeta de 'patch-clamp'), tratată termic special, cu diametrul la vârf de 0.5 – 4 μm, este pusă în contact cu membrana celulară, ce conține N canale ionice, fiecare având probabilitatea de deschidere $P_{(deschis)}$ şi permite trecerea unui curent electric i. În condiții experimentale speciale (e.g., presiune negativă aplicată în pipetă, tratament special al vârfului pipetei şi al membranei celulare) se obține situația în care rezistența electrică a mediului dintre vârful pipetei şi membrana celulară, ce separă porțiunea ('patch') de membrană ce conține canalul ionic de interes de mediul extern, devine de ordinul 5 – 100 GΩ. În aceste circumstanțe, dacă aplicăm între mediul intern al pipetei şi cel extern o diferență de potențial, curentul electric (i) mediat de canalul ionic astfel izolat electric poate fi relativ uşor de separat de zgomotele electrice externe şi analizat.

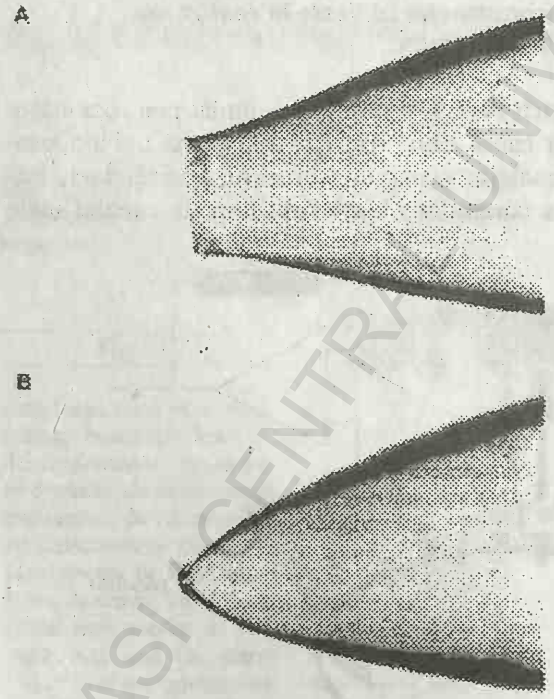


Fig. 94. Fotografii ce arată forma capătului pipetei de *'patch-clamp'* ce izolează un canal ionic, înainte (A) şi după tratament termic (B) [*Luchian, T. 1997. Ph. D. Thesis, Graz*]

În figura alăturată sunt prezentate fotografiile unei pipete de 'patch-clamp', înainte şi după tratamentul termic.

Deşi în aparență simplă, tehnica 'patch-clamp' ridică din punct de vedere tehnologic probleme destul de consistente, datorită faptului că se urmăreşte identificarea unor curenți electrici de ordinul picoamperilor, cu frecvențe mari (1 – 10 kHz), care sunt foarte uşor 'degradați' de zgomotele electrice externe (vezi mai jos).

În următoarea figură (Fig. 95), este prezentată schematic partea electronică a unui dispozitiv de 'patch-clamp', ce permite măsurarea curenților ionici în condiții de potențial fixat ('voltage-clamp').

BCU ASI CENTRALA UNIVERSITARA

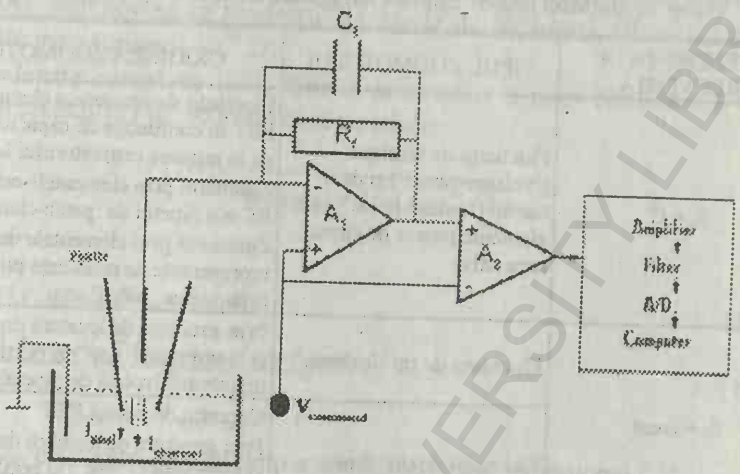


Fig. 95. Schema electronică de principiu a unui dispozitiv de *'patch-clamp'*, ce permite măsurarea curenților ionici în condiții de potențial fixat (*'voltage-clamp'*) [*Luchian, T. 1997. Ph. D. Thesis, Graz*]

Curentul electric total înregistrat cu acest setup are următoarele componente:

$$I_{total} = I_{channel} + I_{seal} + I_{electronics} \qquad (15.2)$$

unde:

- $I_{channel}$ este curentul electric mediat de canalul ionic
- I_{seal} este curentul electric de scurgere, prin rezistența electrică (`seal`) constituită de mediul dintre vârful pipetei de `patch-clamp` și biomembrană
- $I_{electronics}$ este un curent fluctuant, ce reprezintă zgomotul electric introdus de toate elementele pasive și active din circuitul electronic (e.g., rezistența de feed-back a convertorului I-V, curentul de bias al convertorului I-V, etc.)

Ultimele două componente ale curentului electric total sunt surse majore de distorsionare a curentului electric prin canalul ionic. Elemente electronice performante de circuit pot contribui la minimizarea zgomotului electric intrinsec al amplificatorului folosit în aceste măsurători ($I_{electronics}$).

În tabelul de mai jos, sunt prezentate cele mai importantante surse de zgomot electric (ce contribuie la apariția componentei $I_{electronics}$) întâlnite în măsurători tip `patch-clamp` ($S_I(f) = 4kTRe\{Y(f)\}$) și care trebuie minimizate în procesul de măsurare:

BCU CLUJ-NAPOCA BABEŞ-BOLYAI UNIVERSITY LIBRARY

Tabel 11. Cele mai importantante surse de zgomot electric întâlnite în măsurători tip 'patch-clamp' ce afectează negativ calitatea înregistrării curenţilor tip 'single-channel'

DEPENDENŢA DE FRECVENŢĂ	TIPUL ZGOMOTULUI	ORIGINEA ZGOMOTULUI
$S_I \approx f^2$	Fluctuaţii de tensiune (`voltage-noise`) şi de curent (`curent-noise`) prin elemente pasive de circuit, capacitive	Fluctuaţii de tensiune a elementelor FET în conjuncţie cu capacitatea totală de la intrarea convertorului I-V Zgomotul prin elementele echivalente RC ale pipetei de `patch-clamp` Zgomotul prin elementele de circuit reprezentate de rezistenţa pipetei şi capacitatea `patch`-ului
S_I = const.	Fluctuatii de tip `Johnson`	Prin structura de legatură dintre pipetă şi membrană (`seal`) şi porţiunea de membrană izolată de pipeta (`patch`)
	Fluctuatii de tip `shot`	Curentul de poartă FET Prin structura de legatură dintre pipetă şi membrană (`seal`) şi porţiunea de membrană izolată de pipeta (`patch`)
$S_I \approx 1/f^b$	Fluctuatii de tip `flicker`	Prin suportul electrodului Prin pipetă, soluţie apoasă

În ceea ce priveşte cealaltă componentă a curentului electric total (I_{seal}), ea poate fi minimizată odată cu realizarea optimală a izolării patch-ului de membrană ce conţine canalul ionic de interes, când valoarea rezistenţei de `seal` devine de ordinul gigaohmilor iar curentul prin canalul ionic – $I_{channel}$ este mult mai mare în comparaţie cu acel curent electric rezidual, ce se scurge printre vârful pipetei şi suprafaţa celulei – I_{seal}. În acest caz, curentul electric total, în componenţa căruia intră acum mai ales curentul prin canalul ionic de studiat $I_{channel}$, măsurat la o diferenţă de potenţial menţinută constantă ($V_{command}$), este convertit în tensiune (circuitul A1), amplificat (circuitul A2), filtrat, digitizat şi apoi stocat în computer pentru analize ulterioare (Fig. 95).

O problemă tehnică suplimentară ce este inerentă convertoarelor I-V ale amplificatoarelor utilizate în măsurători de tip `patch-clamp` se referă la alterarea benzii de trecere a convertorului de către elementele pasive din bucla de reacţie negativă (feed-back) (Fig. 95). Este cunoscut din analiza circuitelor liniare cu amplificatoare operaţionale faptul că în cazul unui convertor I-V, valoarea tensiunii de la ieşirea convertorului este corelată cu valoarea curentului electric de la intrarea sa prin relaţia:

$$V_{iesire} = -I_{\text{int}rare} R_{feed-back} \qquad (15.3)$$

Aşadar, pentru a măsura curenţii electrici mediaţi de canale ionice individuale (0.5 – 5 pA), este nevoie ca rezistorul din bucla de feed-back ($R_{feed-back}$) să aibă valori foarte mari (ordinul $10^{10}\ \Omega$).

În coordonate complexe ($j\omega$), funcţia de transfer a unui convertor I-V (aşa cum este prezentat în Fig. 95) este dată de relaţia:

$$T(j\omega) = \frac{1}{\tau_0^2 (j\omega)^2 + 2\tau_0 (j\omega)\zeta + 1} \qquad (15.4)$$

unde:

- $\tau_0 = (\tau_{convertor} R_{feed-back} C_t)^{\frac{1}{2}}$ (15.5)
- $\zeta = \frac{1}{2} \frac{\tau_{convertor} + R_{feed-back} C_{feed-back}}{(\tau_{convertor} R_{feed-back} C_t)^{\frac{1}{2}}}$ (15.6)

- $\tau_{convertor}$ este constanta de timp a amplificatorului operaţional I-V
- C_t este valoarea capacităţii totale de la intrarea circuitului operaţional folosit pentru conversia I-V ($C_t = C_{intrare} + C_{feed-back}$)
- $C_{intrare}$ este capacitatea electrică echivalentă a elementelor electrice pasive de la intrarea convertorului (e.g., pipeta de 'patch-clamp', membrana biologică) (nefigurată în Fig. 95).

Dacă valoarea capacităţii totale este de ordinul a 10 pF, se poate estima că pentru obţinerea unei benzi de trecere a convertorului de 10 kHz (τ_0 = 16 μs) este necesar ca circuitul integrat utilizat să aibă constanta de timp $\tau_{convertor} = 2.6\times10^{-9}$ s, iar valoarea capacităţii de 'feed-back' să fie menţinută în jurul valorii de 3.2×10^{-15} F ! Aceste condiţii nu sunt foarte uşor de realizat experimental. Suplimentar, trebuie reţinut că valoarea capacităţii de 'feed-back' nu poate fi micşorată arbitrar oricât ($\zeta < 1$), deoarece convertorul I-V s-ar comporta ca un oscilator (vezi formula funcţiei de transfer al unui convertor I-V de mai sus). În cazul ideal, pentru un circuit integrat dat, $C_{feed-back}$ poate fi modificată (micşorată) până când $\zeta = 1$ (convertorul I-V este amortizat critic).

Pentru a construi convertoare I – V cu benzi de trecere suficient de mari încât să permită înregistrarea curenţilor tip 'patch-clamp' în condiţii spectrale optime, se alege un $C_{feed-back}$ suficient de mare încât $\zeta > 1$, şi în etajele următoare se utilizează elemente electronice speciale pentru îmbunătăţirea benzii de trecere a convertorului I-V ('frequency-boosters').

Tehnica 'patch-clamp' de măsurare a curenţilor electrici mediaţi de proteine individuale prezintă şi avantajul că, în variante experimentale alese de către

BCU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

experimentator, este posibilă studierea unui canal ionic în diferite orientări topologice ce pot prezenta calităţi superioare, în condiţiile unor experimente particulare.

Figura următoare (Fig. 96) prezintă toate variantele experimentale ale tehnicii `patch-clamp`.

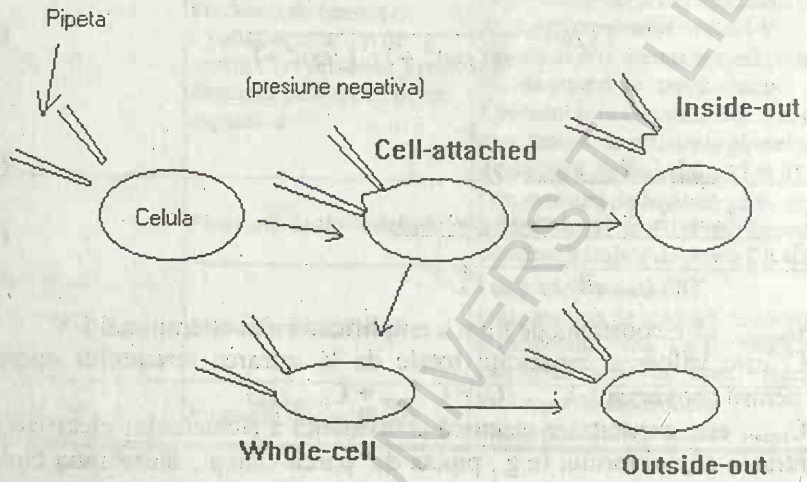


Fig. 96. Variantele experimentale posibile ale tehnicii `*patch-clamp*'
[*Luchian, T. 1997. Ph. D. Thesis, Graz*]

Într-o descriere comprehensivă, aceste variante sunt:

a. **`cell – attached'** – în urma aplicării presiunii negative în interiorul pipetei de `patch-clamp`, se izolează o porţiune (`patch`) de membrană ce conţine canalul ionic de interes, şi se studiază în condiţiile în care el rămâne ca parte componentă a celulei.

b. odată realizată varianta (a), prin retragerea pipetei în afara celulei, se izolează complet acel `patch` de membrană cu proteina (canalul ionic) de interes, obţinându-se varianta **'inside-out'**. Particular acestei variante este că partea citoplasmatică a canalului ionic devine accesibilă experimentatorului. Utilizând această variantă, este facilă studierea efectelor diferiţilor compuşi la interacţiunea cu proteina, ei fiind aplicaţi din partea citoplasmatică a canalului ionic.

c. dacă din varianta (a) se continuă aplicarea presiunii negative în pipetă, se obţine varianta **'whole – cell'**. În acest mod, se poate măsura curentul electric membranar total, cu avantajul posibilităţii de a modificara compoziţia biochimică a mediului citoplasmatic în mod controlabil.

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

d. dacă odată obținută varianta (c) se retrage pipeta de 'patch-clamp' în mediul extracelular, se realizează configurația **'outside-out'**. În această configurație, partea extracelulară a canalului ionic izolat pe vârful pipetei devine accesibilă în mediul extern. Această variantă este opusul variantei menționate la punctul (b).

Aceste modalități de studiere a unui singur canal ionic, în care experimentatorul are deplin control asupra compoziției biochimice a mediului citoplasmatic și extracelular al canalului, coroborat cu posibilitatea oferită de această tehnică de a studia efectele de permeație la nivel molecular, au deschis o nouă eră în biofizica și fiziologia moleculară a canalelor ionice. În acest fel, este posibilă obținerea unor informații esențiale despre structura canalelor ionice, funcțiile lor, cinetica lor și interacțiunea cu alte proteine. Fără aportul științific al acestei tehnici de biofizică moleculară, ne-am fi confruntat cu imposibilitatea de a deduce informații științifice precise despre punctele mai sus amintite.

15.2. *Principii de interpretare stochastică a semnalelor electrice de tip 'patch-clamp'*

Între cele mai importante obiective ale analizei canalelor ionice prin metoda 'patch-clamp', se numără cele de interpretare statistică a semnalelor electrice obținute și de identificare a acestor interpretări cu proprietăți microscopice ale canalelor ionice. Spre deosebire de evoluția temporală a curentului electric total prin biomembrane, mediat de canale ionice, variația curentului electric printr-un singur canal ionic este un proces stochastic, cinetica acestor proteine fiind de tip Markov. Trebuie aici amintit pe scurt că, într-un proces cinetic de tip Markov în care o proteină execută tranziții moleculare între diferite stări distincte (1..i), probabilitatea ca acel canal ionic să execute în intervalul temporal de la t la t + dt o tranziție între stările '$i-2$'$\Leftrightarrow$'$i-1$' nu depinde de istoria tranzițiilor anterioare, ci mai ales de probabilitatea ca la momentul t acel canal ionic să se afle în starea 'i-2'. Cu altte cuvinte, un proces cinetic de tip Markov nu are 'memorie'.

Așa cum este arătat în Fig. 93, în cea mai simplă interpretare, curentul electric mediat de un canal ionic variază între două limite cuantificate ce corespund celor cel puțin două stări moleculare ale canalului ionic: 'închis' (curentul este nul) și 'deschis' (curentul mediat are o valoare finită).

În legătură cu evoluția temporală a curentului electric mediat de acest canal ionic, una dintre cele mai importante mărimi ce o caracterizează este probabilitatea ca proteina (canalul ionic) să sufere o tranziție dintr-o stare moleculară în alta.

Matematic, probabilitatea de tranziție a canalului ionic între stările moleculare (i) şi (j) în intervalul de timp τ, este dată de:

$$P_{ij}(\tau) = \text{prob}\,[j \text{ la } t + \tau \mid i \text{ la } t] = k_{ij}\tau \qquad (15.7)$$

iar:

$$P_{ii}(\tau) = 1 - \text{prob}\,[j \text{ la } t + \tau \mid i \text{ la } t \qquad (15.8)$$

este probabilitatea ca acel canal ionic să *nu* părăsească starea (*i*) în intervalul de timp τ. Parametrii k_{ij} au semnificația unor constante de reacție.

În expresia de mai sus, k_{ij} reprezintă rata de reacție a canalului ionic pentru tranziția între cele două stări, iar P_{ij} sunt doar funcții de τ şi nu de *t* (procesul este de tip Markov).

Pentru un canal ionic ce poate realiza tranziții moleculare stochastice între n stări distincte, se poate defini matricea ratelor de tranziție astfel:

$$Q = \begin{bmatrix} k_{11} & k_{12} & k_{13} & k_{14} & k_{1n} \\ k_{21} & k_{22} & k_{23} & k_{24} & k_{2n} \\ k_{31} & k_{32} & k_{33} & k_{34} & k_{3n} \\ k_{41} & k_{42} & k_{43} & k_{44} & k_{4n} \\ k_{n1} & k_{n2} & k_{n3} & k_{n4} & k_{nn} \end{bmatrix} \qquad (15.9)$$

În această matrice, elementele k_{ij} au semnificația descrisă mai sus, iar elementele diagonale (k_{ii}) sunt egale cu $(-\sum_{j \neq i} k_{ij})$. (suma probabilităților P(i) este egală cu unitatea - canalul ionic *trebuie* să se găsească în una din stările sale posibile la orice moment t). În aceste condiții, matricea Q definită mai sus este singulară.

Cu ajutorul notațiilor de mai sus, se definește într-un mod similar o matrice cu dimensiuni egale formate din elementele P_{ij}, (notată prin P).

Ecuația care exprimă dependența temporală a probabilităților de tranziție între diferite stări moleculare ale canalului ionic este ecuația diferențială a lui Kolmogorov:

$$\frac{dP(t)}{dt} = P(t)Q \qquad (15.10)$$

Definind prin $\lambda_1, \lambda_2, \lambda_3, \lambda_4 \ldots \lambda_n$ valorile proprii ale matricii Q (una dintre ele trebuie să fie nulă - λ_1 de exemplu, deoarece am stabilit că Q este o matrice singulară), matricea Q poate fi scrisă astfel:

$$Q = M\Lambda N \qquad (15.11)$$

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

unde:

- Λ este diag(λ_1, λ_2, λ_3, λ_4...λ_n)
- M este o matrice cu un număr n de coloane unde sunt aşezaţi vectorii proprii ai matricei Q. Orice element m_i este un asemenea vector propriu, organizat în formă de coloană.
- $N = M^{-1}$

Dacă notăm prin A_i matricile de forma $A_i = m_i n_i$ având proprietăţile:

$$A_i A_j = 0 \ (i \neq j) \tag{15.12}$$

$$A_i A_i = A_1 \tag{15.13}$$

$$\sum_{i=1}^{n} A_i = I \tag{15.14}$$

Soluţia ecuaţiei diferenţiale a lui Kolmogorov, scrisă în formă matricială, este dată de:

$$P(t) = \sum_{i=1}^{n} A_i e^{\lambda_i t} \tag{15.15}$$

În acest fel, putem defini acum un alt vector (1 x n):

$$p(t) = [p_1(t) \quad p_2(t) \quad p_3(t) \quad p_4(t) \quad p_5(t) \ldots \quad p_n(t)] \tag{15.16}$$

ale cărui elemente reprezintă probabilităţile ca un canal ionic să fie într-o stare particulară (j) la momentul t:

$$p_j(t) = \sum_{i=1}^{n} p_i(0) P_{ij}(t) \tag{15.17}$$

După cum se observă din relaţia de mai sus, în urma unei perturbaţii a unui canal ionic aflat într-o stare de echilibru oarecare la momentul iniţial, el evoluează într-o nouă stare de echilibru şi cinetica probabilităţii de ocupare a oricărei stări particulare $p_i(t)$ finale descrie o lege temporală multiexponenţială.

Acum putem înţelege mai bine mecanismul microscopic prin care curentul ionic macroscopic, înregistrat într-un sistem celular de N canale ionice identice şi care apare în urma unei perturbaţii (e.g., depolarizare – ecuaţiile Hodgkin-Huxley), urmează o lege de evoluţie temporală multiexponenţială:

$$I(t) = N(V - V_{Nernst})(\sigma_1 p_1(t) + \sigma_2 p_2(t) + \sigma_3 p_3(t) + \ldots \sigma_n p_n(t)) \tag{15.18}$$

unde:

V – diferenţa de potenţial aplicată din exterior asupra canalului ionic

V_{Nernst} – potenţialul Nernstian al canalului ionic

σ_i – conductanţa electrică a stării (i) a canalului ionic

$P_i(t)$ – probabilitatea ca la momentul t, proteina să se afle în starea moleculară i

BCU CLUJ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Este remarcabil acest comportament macroscopic, având în vedere că procesele moleculare individuale *ale fiecărui canal ionic în parte* sunt stochastice (acest aspect va fi abordat şi în cele ce urmează).

Una din primele informaţii ce pot fi deduse experimental din analiza datelor 'patch-clamp' este legată de conductanţa electrică a canalului ionic.

În acest scop, se înregistrează activitatea canalului ionic de interes la diferite valori ale diferenţei de potenţial aplicate din exterior şi apoi se realizează histograme ale amplitudinii curentului electric măsurat în acele condiţii (Fig. 97).

Măsurând din aceste histograme valoarea curentului electric mediat de canalul ionic la diferite valori ale diferenţei de potenţial aplicate, se poate realiza reprezentarea grafică $i_{canal\ ionic} = i_{canal\ ionic}(V)$ din care se deduce imediat valoarea conductanţei electrice a canalului ionic studiat. În legătură cu această afirmaţie, trebuie subliniat un fapt important: având în vedere faptul că în astfel de experimente în care este posibilă înregistrarea curentului ionic individual prin canalul ionic ($i_{canal\ ionic}$), rezistenţa electrică a conexiunilor aferente circuitului de măsurare (e.g., rezistenţa totală a electrozilor) este de ordinul MΩ-lor, eroarea introdusă de aceasta la evaluarea exactă a rezistenţei electrice *a canalului ionic* (~ 10^9 Ω) fiind practic neglijabilă. Acest tip de experimente sunt foarte importante pentru studierea proceselor de permeaţie prin canalele ionice, cu scopul elaborării unui model fizic adec-

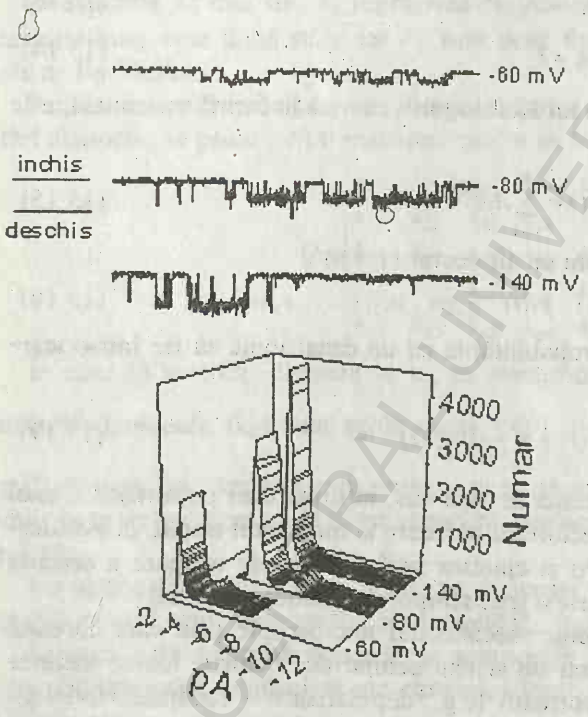


Fig. 97. Reprezentarea înregistrării activităţii unui canal ionic la diferite valori ale diferenţei de potenţial aplicate din exterior şi realizarea histogramelor amplitudinii curentului electric măsurat în acele condiţii (*Tudor Luchian, rezultate nepublicate*)

vat, capabil să descrie molecular difuzia ionilor prin porul acestor proteine. După cum vom vedea într-un capitol următor, pentru modelarea proceselor de permeație prin canale ionice, cu scopul de a descrie cu cât mai mare acuratețe fizică permeația ionică, este nevoie de utilizarea datelor experimentale ce reprezintă fluxurile (sau curenții electrici) mediați de un canal ionic studiat, și nu de o populație de canale ionice.

O altă informație importantă ce poate fi dedusă din înregistrări tip 'patch-clamp' se referă la estimarea valorii probabilității de deschidere ('open probability') a unui canal ionic, în anumite condiții fizice. Pentru aceasta, cu ajutorul unor programe de computer special elaborate, dintr-o înregistrare 'patch-clamp' ce arată evoluția cinetică a unui canal ionic în timp, se estimează valoarea timpului total pe care acel canal ionic îl petrece în starea 'deschis'.

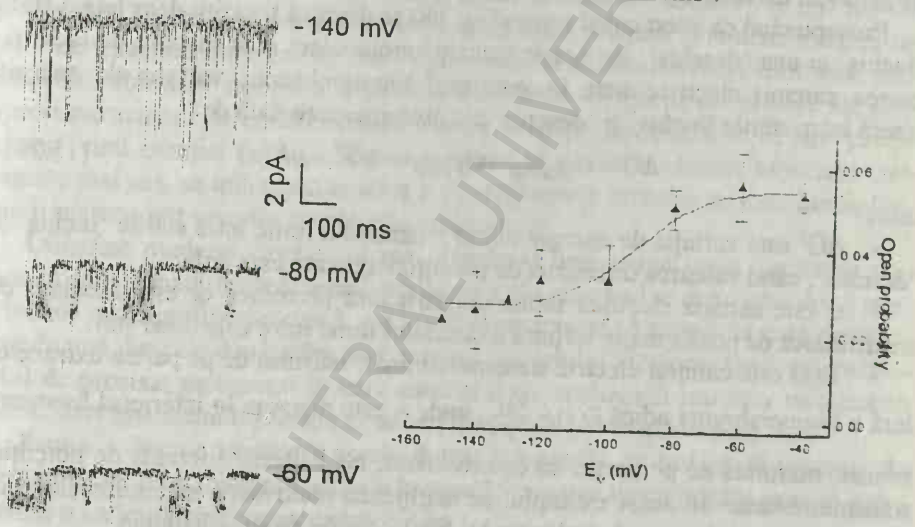


Fig. 98. Estimarea valorii probabilității de deschidere ('*open probability*') a unui canal ionic, în anumite condiții fizice (valori distincte ale diferenței de potențial aplicate din exterior) [*Luchian, T. 1997. Ph. D. Thesis, Graz*]

Probabilitatea de deschidere ($P_{deschis}$ sau 'open probability') a canalului într-o anumită stare conductivă este dată de relația:

$$P_{deschis} = \frac{t_{conductiv}}{t_{inregistrare}} \qquad (15.19)$$

unde:

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- $t_{conductiv}$ reprezintă timpul petrecut de canalul ionic în starea conductivă analizată
- $t_{înregistrare}$ este timpul total al înregistrării semnalului de 'patch-clamp'

În Fig. 98 este prezentată sintetic, pentru exemplificare, analiza dependenței probabilității de deschidere a unui canal ionic de potasiu în funcție de valoarea diferenței de potențial la care are loc evoluția cinetică a respectivei proteine. În acest exemplu, deoarece probabilitatea de deschidere a canalului ionic este dependentă de valoarea diferenței de potențial transmembranar, putem concluziona că 'gating'-ul acestui canal ionic implică modificări de structură ale canalului ionic în care sunt implicate reziduuri aminoacidice cu sarcina electrică netă diferită de zero sau caracter dipolar ce sunt localizate în interiorul biomembranei.

Presupunând că acest canal ionic (Fig. 98) realizează tranziții doar într-o stare 'închis' și una 'deschis', iar aceste tranziții moleculare sunt însoțite de redistribuirea sarcinii electrice nete în interiorul biomembranei, variația de energie liberă între stările 'închis' și 'deschis' ale proteinei este dată de:

$$\Delta G = G_{deschis} - G_{închis} = \Delta G^0 - qE(x) \qquad (15.20)$$

unde:

- ΔG^0 este variația de energie liberă a canalului ionic între stările 'închis' și 'deschis', când valoarea diferenței de potențial aplicate este nulă
- q este sarcina electrică totală din structura proteinei, ce este asociată cu modificarea de conformație terțiară a canalului ionic între cele două stări
- E(x) este câmpul electric transmembranar, măsurat de pe partea extracelulară a biomembranei adică $E(x) = \frac{E_M}{x}$, unde x este distanța în interiorul biomembranei, măsurată de pe partea sa extracelulară, iar E_M este diferența de potențial transmembranar. În acest exemplu, se neglijează contribuția sarcinilor electrice superficiale membranare la valoarea lui E(x) – teoria Gouy-Chapman.

În aceste condiții, raportul între probabilitățile ca proteina să fie în starea 'deschis' ($p_{deschis}$) și 'închis' ($p_{închis}$) respectă o lege de distribuție după energie de tip Boltzmann:

$$\frac{p_{deschis}}{p_{închis}} = \exp\left(\frac{-\Delta G}{kT}\right) \qquad (15.21)$$

Știind că $p_{deschis} + p_{închis} = 1$, relația de mai sus devine:

$$p_{deschis} = \frac{1}{1 + \exp\left(\frac{\Delta G}{kT}\right)} \qquad (15.22)$$

BCU IAȘI CENTRUL UNIVERSITAR LIBRARY

În cadrul acestui model simplificat, ecuația de mai sus reprezintă estimarea cantitativă a variației probabilității de deschidere a canalului ionic de potasiu cu diferență de potențial transmembranar, așa cum indică datele experimentale prezentate în Fig. 98. Concluziile acestor experimente sunt esențiale pentru înțelegerea proceselor de 'gating' ale canalelor ionice: alterarea 'gating'-ului unui canal ionic, fapt exprimat cel mai simplu prin modificarea probabilității de deschidere, în diferite condiții experimentale controlabile (e.g., diferența de potențial transmembranar, interacțiunea canalului ionic cu alți agoniști etc.), pot constitui indici prețioși despre mecanismele fizice ce stau la baza dinamicii proteinei.

Atât în capitolele anterioare, cât și în paragrafele precedente am subliniat faptul că unele din întrebările fundamentale legate de structura și funcțiile canalelor ionice se referă la estimarea numărului exact de stări moleculare (de tip 'închis' și 'deschis') pe care le poate asuma un canal ionic precum și la determinarea ratelor de tranziției între aceste stări. Răspunsul la aceste întrebări constituie fundamentul abordării științifice a elucidării schemei de reacții moleculare ale unei specii particulare de canale ionice. Pentru aceasta, înregistrările de tip 'patch-clamp' sunt esențial de realizat experimental și pentru a elucida aspectele enumerate mai sus, se utilizează analiza cu histograme a timpilor pe care canalul ionic îi petrece într-una din stările sale moleculare.

Utilizând modelul cinetic cel mai simplu al unui canal ionic, prezentat mai sus, în care tranzițiile moleculare stochastice ale sale au loc doar între două stări ('închis' și respectiv 'deschis'), este facil de remarcat că timpii, în care proteina este în una din cele două stări, sunt mărimi (variabile) aleatorii. Deci, este imposibil de precizat momentul în care canalul ionic realizează tranziția moleculară într-o stare particulară, precum și durata temporală petrecută în acea stare.

Pentru a descrie cantitativ aceste durate temporale, se utilizează funcțiile de distribuție de probabilitate (pdf) ale lungimilor acestor timpi în care canalul ionic asumă o anumită conformație moleculară.

Pentru un canal ionic având cinetica descrisă experimental, putem defini pdf corespunzătoare (de exemplu) timpilor pe care canalul ionic îi petrece în starea 'deschis' astfel:

$$f(t) = \lim_{\Delta t \to 0} \left[Prob \frac{\text{timpul cât este în starea 'deschis' este cuprins între } t \text{ și } t - \Delta t}{\Delta t} \right] \qquad (15.23)$$

Pentru a determina expresia funcției f(t), definim o altă funcție probabilistică (notată cu R(t)) dată de:

$$R(t) = Prob(\text{canalul ionic este în starea 'deschis' pe toată durata cuprinsă între } 0 \text{ și } t) \qquad (15.24)$$

Considerând schema de reacții moleculare ce este asociată modelului simplu (cu două stări) expus mai sus astfel:

$$'deschis' \underset{\beta}{\overset{\alpha}{\Leftrightarrow}} 'închis' \tag{15.25}$$

unde α si β sunt ratele de reacţie pentru 'închiderea', respectiv 'deschiderea' canalului ionic (ce sunt procese stochastice), putem defini probabilitatea ca acest canal ionic să se închidă în intervalul de timp de la t la t+Δt astfel:

$$Prob(\text{canalul ionic se închide în timpul } t + \Delta t / \text{ştiind căă fost deschis la } t) = \alpha \Delta t \tag{15.26}$$

Cu ajutorul probabilităţilor condiţionale, definim în continuare:

$$R(t+\Delta t) = Prob(\text{canalul ionic este deschis pe toata durata de la 0 la } t+\Delta t) \tag{15.27}$$

deci:

$$R(t+\Delta t) = Prob(\text{deschis de la 0 la } t) \cdot Prob(\text{deschis de la } t \text{ la } t+\Delta t / \text{dacăao fost deschis pe toatătdurata de la 0 la } t)$$

Utilizând presupunerea că procesul stochastic descris până acum este de tip Markov, adică evoluţia sistemului de la momentul t la t+Δt depinde doar de starea în care se află sistemul la momentul t, şi nu de toată istoria procesului între 0 şi t, putem scrie:

$$Prob(\text{deschis de la } t \text{ la } t+\Delta t / \text{dacă/dă fost deschis pe toatătdurata de la 0 la } t) = Prob(\text{deschis de la } t \text{ la } t+\Delta t / \text{dacă/dă fost deschis la } t) \tag{15.28}$$

Utilizând funcţiile definite mai sus, putem scrie acum:

$$R(t+\Delta t) = R(t)[1-\alpha\Delta t] \quad \textit{sau} \quad \frac{R(t+\Delta t)-R(t)}{\Delta t} = -R(t)\alpha \tag{15.29}$$

În cazul în care procesul stochastic analizat este şi staţionar, adică ratele de tranziţie între cele două stări nu depind de timp, soluţia ecuaţiei de mai sus se scrie astfel:

$$R(t) = e^{-\alpha t} = Prob(\text{timpul în care canalul ionic este în starea 'deschis' este} > t) \tag{15.30}$$

Astfel,

$$Prob(\text{timpul în care canalul ionic este în starea 'deschis' este} < t) = 1 - R(t) = 1 - e^{-\alpha t} = F(t) \tag{15.31}$$

Utilizând această ultimă relaţie, funcţia de densitate de distribuţie a timpilor în care canalul ionic este în starea 'deschis' este dată de:

$$f(t) = \frac{dF(t)}{dt} = -\frac{dR(t)}{dt} = \alpha e^{-\alpha t} \tag{15.32}$$

În mod asemănător, se poate determina funcţia de densitate de distribuţie a timpilor petrecuţi de canalul ionic în starea 'închis' sau orice stare moleculară intermediară, vizibilă în experimente de 'patch-clamp'.

Acestor funcţii de densitate de distribuţie de probabilitate (de tip exponenţial), aşa cum au fost descrise matematic mai sus, le sunt asociate experimental histogramele timpilor petrecuţi de canalul ionic în una din cele două stări ('deschis' sau 'închis') (Fig. 99).

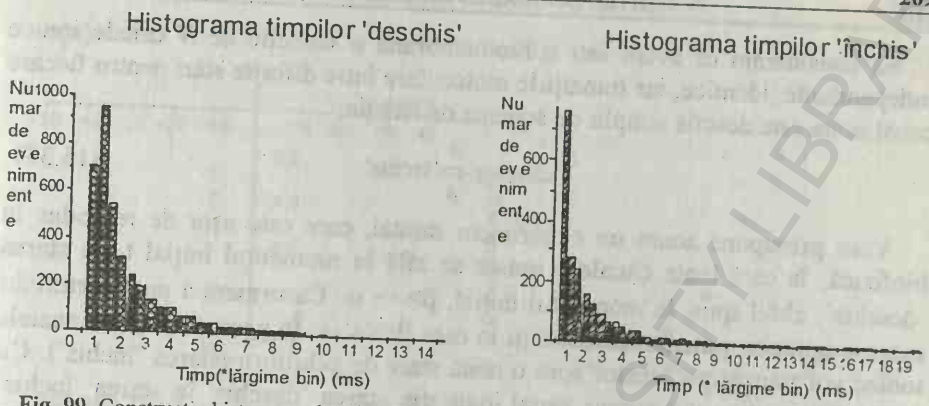


Fig. 99. Construcția histogramelor timpilor petrecuți de canalul ionic în una din cele două stări (`deschis` sau `închis`), ce evoluează între două stări moleculare distincte (vezi și Fig. 93) [*Luchian, T. 1997. Ph. D. Thesis, Graz*]

Din studiul cu histograme dezvoltat mai sus putem extrage cele mai importante informații despre `gating`-ul canalelor ionice:

➢ ca o regulă generală, este demonstrat că și în cazul schemelor cinetice mult mai complexe, numărul de funcții tip exponențial care sunt necesare pentru a fita corect histogramele timpilor `deschis` și `închis` este egal cu numărul minim de stări cinetice de tip `deschis` și `închis` ale canalului ionic studiat. Așadar, este posibilă determinarea numărului minim de stări moleculare discrete din schema de reacție a unui canal ionic, precum și natura lor, din punct de vedere al proprietăților de conducție

➢ suplimentar, fitarea experimentală a acestor histograme cu funcții exponențiale furnizează informații despre valorile ratelor de tranziție între stările moleculare `închis` și `deschis` ale canalului ionic (pentru modelul simplu ales, α și β). În acest fel, interpretarea experimentelor de tip `patch-clamp` consolidează premizele studierii schemelor cinetice ale canalelor ionice, și constituie baza înțelegerii la nivel molecular a funcționării acestor proteine.

Trebuie subliniat încă o dată că doar experimentele de `patch-clamp` și, evident, interpretarea lor inteligentă pot ajuta la înțelegerea proprietăților cinetice ale canalelor ionice, în detaliile arătate mai sus.

Ca un rezultat adițional derivat din dezvoltarea matematică anterioară, putem explica în acest moment una din paradigmele interesante ale canalelor ionice, aplicabilă de altfel și în cazul altor procese fizice, cum ar fi dezintegrarea radioactivă.

BCU CLUJ / UNIVERSITY LIBRARY

Să considerăm că avem într-o biomembrană o colecție de N canale ionice independente, identice, iar tranzițiile moleculare între diferite stări pentru fiecare canal ionic este descris simplu de schema de reacție:

$$'deschis' \underset{\beta}{\overset{\alpha}{\Leftrightarrow}} 'închis' \qquad (15.33)$$

Vom presupune acum un experiment mintal, care este ușor de reprodus în biofizică, în care toate canalele ionice se află la momentul inițial t_0 în starea 'deschis', altfel spus, la momentul inițial, $\beta >>> \alpha$. Ca urmare a unei perturbări externe aplicate, putem crea condiții în care $\beta <<< \alpha$. În acest fel, toate canalele ionice vor tranziționa aleator spre o nouă stare de echilibru (starea 'închis'). Cu toate că tranziția unui singur canal ionic din starea 'deschis' în starea 'închis' este un fenomen aleator, se poate observa că variația în timp a curentului macroscopic, mediat de toate canalele ionice, este o funcție deterministă, de tip exponențial (descrescătoare). Cum se poate explica acest aparent paradox ? Răspunsul este simplu, dacă utilizăm noțiunile dezvoltate mai sus; astfel, valoarea curentului macroscopic înregistrat poate fi scrisă astfel:

$$I(t) = i_{individual} N_0 F(t) \qquad (15.34)$$

unde:

- $i_{individual}$ este curentul electric printr-un singur canal ionic
- N_0 este numărul de canale ionice în starea 'deschis' la momentul t_0
- F(t) este o funcție ce dă probabilitatea ca în timpul de la t_0 la t, să mai găsim un canal ionic în starea 'deschis' (această funcție este identică cu funcția 1 – R(t) descrisă anterior)

Din deducerile anterioare, am arătat că:

$$F(t) = 1 - R(t) = 1 - e^{-\alpha t} \qquad (15.35)$$

În acest fel, rezultă imediat că variația temporală a curentului electric macroscopic este descrisă de o lege deterministă, binecunoscută în fizică:

$$I(t) = i_{individual} N_0 (1 - e^{-\alpha t}) \qquad (15.36)$$

Cu ajutorul conceptelor prezentate mai sus despre proprietățile canalelor ionice, se poate oferi o interpretare fizică elegantă a fenomenului de dependență de diferența de potențial transmembranar a conductivității electrice a unei populații de canale ionice.

Pentru aceasta, se consideră drept exemplu canalele ionice de calciu voltaj-dependente de tip N; studii experimentale de electrofiziologie arată că diagrama 'curent' – 'tensiune' a unei populați de asemenea canale ionice este ca mai jos:

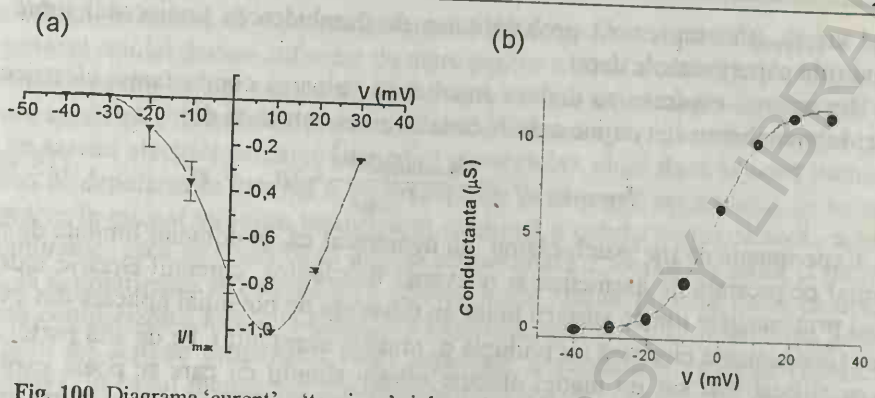


Fig. 100. Diagrama 'curent' – 'tensiune' şi dependenţa conductanţei electrice de diferenţă de potenţial de depolarizare a unei populaţii de canale ionice de calciu voltaj-dependente de tip N (*Tudor Luchian, rezultate nepublicate*)

După cum se observă din figura anterioară, canalele ionice de calciu de tip N sunt voltaj-dependente în sensul că există o dependenţă intrinsecă a curentului electric macroscopic mediat de acestea în funcţie de diferenţa de potenţial transmembranar. Aşadar, pe măsură ce membrana biologică ce conţine aceste canale ionice este depolarizată la valori superioare (biomembrana este polarizată), conductivitatea electrică a biomembranei, calculată utilizând datele din panelul A al figurii de mai sus după formula $\sigma = \frac{I_{max}}{V - V_{Nernst}}$, creşte după o lege de tip Boltzmann (vezi mai sus pentru justificare în cadrul celui mai simplu model). La o anumită valoare a depolarizării membranei, conductivitatea acesteia atinge o valoare maximă, constantă. O întrebare fundamentală în neurobiofizică este următoarea: ce procese fizice membranare conduc la forma specifică, dependenţă de tip Boltzmann, a conductanţei unei biomembrane ce conţine inserate canale ionice voltaj-dependente ?

Pentru a răspunde la această întrebare, se vor utiliza câteva din noţiunile prezentate anterior.

Aşadar, pentru o biomembrană ce conţine N canale ionice voltaj-dependente identice, fiecare având conductivitatea individuală σ_i, variaţia în raport cu diferenţa de potenţial transmembranară a curentului macroscopic este dată de expresia:

$$I_{macroscopic}(V) = [V - V_{Nernst}] N p_{open}(V) \sigma_i \qquad (15.37)$$

(V şi V_{Nemst} reprezintă valoarea diferenţei de potenţial aplicate din exterior biomembranei şi, respectiv, a potenţialului Nernstian a fiecărui canal ionic indivi-

BOLIAC MEDICAL UNIVERSITY LIBRARY

dual iar $p_{open}(V)$ reprezintă probabilitatea de deschidere a unui canal ionic în condiţiile experimentale date).

Din această expresie, se deduce imediat că valoarea conductanţei electrice a unei biomembrane ce conţine cele N canale ionice este dată de:

$$\sigma_{macroscopic}(V) = \frac{I_{macroscopic}(V)}{V - V_{Nernst}} = N p_{open}(V) \sigma_i \qquad (15.38)$$

Experimente de tip 'patch-clamp' au demonstat că, în domenii limitate de potenţial ce prezintă de asemenea şi relevanţă fiziologică, curentul electric individual prin canalele ionice variază liniar cu diferenţa de potenţial aplicată din exterior (conductanţa electrică individuală σ_i rămâne constantă). Pe de altă parte, am exemplificat mai sus un model electric relativ simplu cu care se poate explica forma Boltzmann-ianã a variaţiei probabilităţii de deschidere a unui canal ionic individual cu diferenţă de potenţial aplicată ($p_{open}(V)$).

Combinând aceste date, se explică forma observată experimental a dependenţei de voltaj a conductanţei unui biomembrane ce conţine canale ionice voltaj-dependente.

Un alt subiect important de studiat îl reprezintă explicarea unor observaţii fundamentale făcute de Hodgkin şi Huxley cu privire la proprietăţile potenţialelor de acţiune propagabile în membrane excitabile. Probabil cele mai importante observaţii făcute de cei doi cercetători au fost:

- un potenţial de acţiune propagabil se generează doar după ce depolarizarea biomembranei depăşeşte o anumită valoare (valoare de prag – 'threshold')
- odată depăşită valoarea de prag a depolarizării, amplitudinea maximă a potenţialului de acţiune iniţiat în biomembrana excitabilă studiată rămâne constantă, independentă de valoarea tensiunii de depolarizare

Pentru a explica aceste observaţii, se pot utiliza câteva din datele prezentate mai sus. Aşadar, am arătat că într-un domeniu limitat de valori ale diferenţei de potenţial transmembranar, valoarea conductanţei macroscopice a biomembranei ce conţine canale ionice voltaj-dependente este practic nulă. Teoretic, la aceste valoari ale diferenţei de potenţial transmembranar, probabilitatea de deschidere a canalelor ionice voltaj-dependente este extrem de mică, dar diferită de zero. Pe măsură ce membrana biologică care conţine aceste canale ionice devine depolarizată la valori mai mari decât o valoare limită-inferioară (Fig. 100), conductanţa macroscopică a biomembranei creşte accentuat cu valoarea tensiunii de depolarizare urmărind o curbă de dependenţă de tip Boltzmann. Există, însă, o valoare de depolarizare membranară specifică, pentru care conductanţa biomembranei devi-

ne critică, în sensul că valoarea curentului de sodiu de tip 'inward' dirijat spre interiorul celulei devine suficient de mare pentru a contrabalansa orice curent de potasiu sau clor de tip 'outward', dirijat spre mediul extracelular. La această valoare specifică ('threshold') a tensiunii de depolarizare va exista o acumulare netă de sarcini electrice pozitive în mediul intracelular: chiar dacă în acest moment sursa de depolarizare externă a biomembranei se elimină, acumularea de sarcini pozitive în citosol va iniția modificarea continuă a conductanței de sodiu a biomembranie, ceea ce conduce la difuzia intracelulară a ionilor de sodiu și, implicit, la depolarizarea în continuare a celulei. Acest lanț de procese fizice ce determină depolarizarea locală în cascadă a biomembranei conduce la inițierea potențialului de acțiune propagabil (vezi capitolele anterioare – modelul Hodgkin-Huxley). În cazul majorității membranelor excitabile, canalele de sodiu voltaj-dependente sunt cele care inițiază depolarizarea locală a membranei, conducând astfel la geneza unui potențial de acțiune. Pentru a surprinde mecanismul fizic prin care activarea locală a acestor canale ionice conduce la modificarea diferenței de potențial transmembranar (mai precis, depolarizarea membranei) vom reaminti câteva concepte deja discutate anterior: în starea inițială de echilibru, biomembrana este conductivă mai ales pentru ionii de potasiu care permează prin canale de potasiu voltaj-independente. Deoarece concentrația ionilor de potasiu în mediul intracelular ($[K^+]_i$) este mai mare decât mediul extracelular ($[K^+]_o$), aceştia vor permea pasiv în mediul extracelular până când se stabileşte starea de echilibru a difuziei lor Această stare este caracterizată de valoarea nulă a curentului ionic de potasiu prin biomembrană mediat de aceste canale ionice, cauzată de o valoare de potențial de echilibru transmembranar (vezi capitolele anterioare). Pentru majoritatea celulelor excitabile, valoarea acestui potențial de repaus este cuprinsă între –50 mVsi -70 mV, măsurat între mediul extracelular pus la masă şi citosol. Trebuie subliniat că în cazul majorității neuronilor, diferența de potențial transmembranar de repaus este de ~ -50 mV și este mai mică în valoare absolută decât potențialul Nernst al canalelor ionice de potasiu

$$V_{Nernst-K} = \frac{RT}{F} \ln \left[\frac{K^+}{K^+} \right]_o^i \quad (\sim -90 \text{ mV}).$$

Menționam anterior că această situație se datorează existenței și altor specii de canale ionice, chiar dacă într-un număr mai mic, deschise în starea staționară inițială a membranei. Pentru ionii de sodiu, distribuția concentrațiilor ionice între cele două medii este inversată ($[Na^+]_o > [Na^+]_i$), iar valoarea potențialului Nernst pentru aceşti ioni în cazul celulelor excitabile ($V_{Nernst-Na}$) are valori în domeniul +40 mV şi +70 mV. Aşadar, la diferențe de potențial membranare mai mici decât $V_{Nernst-Na}$, ionii de sodiu vor avea tendința de a difuza pasiv în citosol,

facilitând astfel modificarea în sens pozitiv a diferenței de potențial transmembranară sau polarizarea celulei. Am stabilit însă că la diferențe de potențial transmembranare de echilibru, de ordinul $V_{Nernst\text{-}K}$, marea majoritate a canalelor de sodiu sunt în starea moleculară neconductivă 'închis'. Un stimul electric extern (o depolarizare ce depăşeşte o anumită valoare critică 'threshold') determină tranziția acestor canale ionice de sodiu spre starea 'conductivă' (vezi mai sus), şi astfel se declanşează procesul de polarizare continuă a biomembranei datorat difuziei transmembranare pasive, spre citosol, a ionilor de sodiu.

În acest fel, conductanța macroscopică a biomembranei studiate se va modifica continuu în funcție de diferența de potențial transmembranară locală, până la o valoare limită-superioară, iar diferența de potențial transmembranară local va atinge un maxim - $V_{Nernst\text{-}Na}$ -, ce coincide cu 'peak'-ul potențialului de acțiune local. Aşadar, atât timp cât depolarizarea inițială locală a biomembranei depăşeşte o valoare limită ('threshold'), orice astfel de depolarizare electrică transmembranară va conduce în final la aceeaşi valoare maximă a valorilor polarizării celulei şi a conductanței macroscopice a biomembranei pentru ionii permeanți. Această valoare maximală a conductanței electrice a biomembranei este determinată de valoarea limită maximă a diferenței de potențial biomembranare ce apare în cursul excitației nervoase şi care corespunde experimental 'peak'-ului potențialului de acțiune înregistrat local în membranele excitabile.

Trebuie menționat că valoarea acestui 'peak' depinde de mulți factori, printre care amintim:

- natura şi proprietățile electrice ale canalelor ionice voltaj-dependente ce contribuie la depolarizarea biomembranei
- valorile concentațiilor intra- şi extracelulare ale ionilor permeanți ce inițiază declanşarea potențialului de acțiune în membrana studiată
- natura şi proprietățile electrice ale canalelor ionice voltaj-dependente ce contribuie la repolarizarea biomembranei (vezi modelul Hodgkin-Huxley)
- pH-ul, tăria ionică a soluțiilor intra- şi extracelulare

BCU IAŞI / CENTRUL VECHI

16. Modele de permeație ionică a canalelor ionice

Difuzia ionică prin proteine membranare integrale specializate (i.e., canale ionice), reprezintă unul din procesele fizice fundamentale ce au loc în toate celulele vii. Prezența acestor fluxuri ionice este corelată intrinsec prin intermediul 'teoriei cablului' (vezi capitolele anterioare) cu generarea și propagarea potențialelor de acțiune în membranele biologice excitabile. După cum a fost subliniat anterior, canalele ionice posedă o structură tri-dimensională specifică, numită por, care reprezintă calea cea mai favorabilă energetic pentru difuzia ionică prin biomembrane. Structura de por a unui canal ionic reprezintă o arhitectură moleculară complexă, compusă din aminoacizi ce provin din diferite părți (monomeri) ai unui canal ionic și care constituie atât calea de permeație a ionilor prin biomembrană, cât și filtrul de selectivitate ionică, ce particularizează denumirea unui canal ionic. Rezultatele ultimelor decenii de cercetări în biofizica moleculară și ingineria genetică au reușit să facă lumină în conceperea realistă a organizării spațiale a porului unor canale ionice: astfel, încă din anul 1998, laboratorul condus de R. MacKinnon a publicat structura cristalină a unui canal ionic de potasiu bacterial (din *Streptomyces lividans*) din măsurători de cristalografie cu radiații X (Fig. 101).

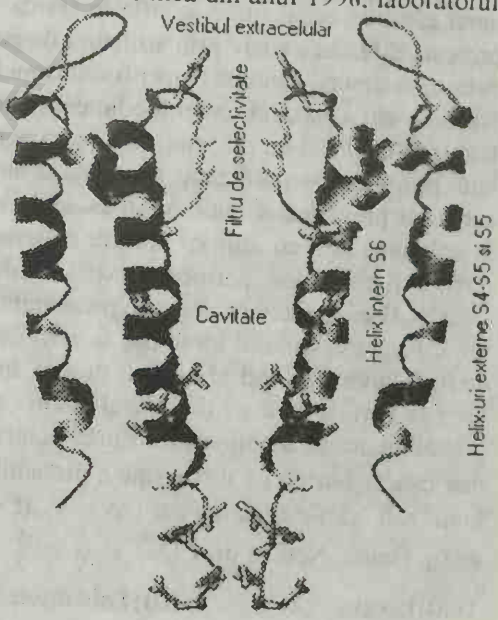


Fig. 101.

Arhitectura funcțională a canalului ionic de potasiu bacterial (din *Streptomyces lividans*) așa cum a fost dedusă din măsurători de cristalografie cu radiații X. Sunt prezentate părțile laterale a două din cele patru subunități ce formează subunitatea principală (α) a canalului ionic și sunt evidențiate topologia filtrului de selectivitate ionică precum și cea a porului permeant [după *Yellen, G. 1999. Curr. Opin. Neurobiol. 9*]

BCU CENTRAL LIBRARY

În această structură, este evidențiată elegant organizarea tetramerică a acestui canal ionic precum şi topologia porului proteinei.

Pentru a descrie cantitativ procesele de difuzie ionică prin canalele ionice via porul canalului, se utilizează în prezent trei teorii distincte:

1. teoria Nernst-Planck
2. modelarea moleculară browniană a dinamicii ionilor prin por, utilizând ecuația lui Langevin
3. teoria lui Eyring

16.1. *Teoria Nernst-Planck*

O introducere în abordarea macroscopică Nernst-Planck a transportului ionic transmembranar a fost făcută într-un capitol anterior. Cu noțiunile introduse în paragrafele precedente acestui sub-capitol (e.g., canal ionic, 'gating'), se poate afirma că fluxul macroscopic de ioni ce traversează o biomembrană este determinat de numărul mediu de canale ionice aflate în starea `deschis` la orice moment de timp şi fluxul ionic individual, mediat de fiecare canal ionic în parte. Atunci când un canal ionic se afla în starea 'deschis', ionii permeanți prin acea proteina difuzează pasiv prin structura de por a proteinei, iar acest proces de difuzie este descris cantitativ prin formalismele mişcării browniene. Porul canalului ionic este conceput ca un mediu continuu ce conține diferite grupări moleculare (sau atomice) cu caracter de sarcină netă electrică diferită de zero sau dipolară, prin care ionii difuzanți traversează biomembrana. Se consideră că, în mişcarea lor prin canalul ionic, ionii execută mişcări aleatorii în cursul cărora intră în coliziune unii cu alții iar fiecare coliziune produce modificări stochastice în poziția fiecărui ion permeant (x(t)). Colecția valorilor $\{x_1(t_1), x_2(t_2), x_3(t_3), \ldots x_n(t_n)\}$ ce reprezintă, într-o reprezentare uni-dimensională, coordonatele unui ion difuzant în canalul ionic pot fi considerate valori ale unui proces stochastic de tip Markov. În cadrul acestui proces, un ion difuzant poate asuma valori ale lui $x_n(t_n)$ oricât de mari (în sensul pozitiv şi negativ al axei de coordonate), dar probabilitatea de a obține valori mari pentru variabila $x_n(t_n)$ este destul de redusă: mai exact, funcția de distribuție a probabilității ca după un interval Δt lungimea unui `salt` să fie egală cu Δx ($\Delta x = x_{i+1}(t + \Delta t) - x_i(t)$) are forma unei distribuții de tip Gauss. Notând prin $\langle \Delta x \rangle_x$ si $\left\langle (\Delta x)^2 \right\rangle_x$ valorile medii (pe ansamblul valorilor $\{x_1(t_1), x_2(t_2), x_3(t_3), \ldots x_n(t_n)\}$) ale diferențelor distanțelor succesive ($x_n(t_n) - x_{n-}$

BCU IASI UNIVERSITY LIBRARY

$_1(t_{n-1})$ și pătratelor acestor diferențe măsurate în intervalul de timp Δt, în cazul unor ipoteze suplimentare, simplificatoare, ale procesului de difuzie (vezi ecuația Fokker-Planck, mai jos), următoarele relații sunt adevărate

$$a_1(x) = \frac{\langle \Delta x \rangle_x}{\Delta t} = 0$$

$$\text{și} \qquad (16.1)$$

$$a_2(x) = \frac{\left\langle (\Delta x)^2 \right\rangle_x}{\Delta t} = const.$$

Trebuie notat că valoarea coeficientului a_1 este nulă doar în absența unui câmp de forțe extern sau al unui gradient de concentrație ionică; în aceste condiții specifice, viteza de drift a ionilor permeanți este de asemenea nulă. În particular, valorile coeficienților $a_i(x)$ se deduc din aplicarea ecuației Langevin pentru mișcarea haotică a ionilor, în cursul procesului de difuzie (Cooper, K. E., Gates, P. Y., Eisenberg, R. S. 1988. Quarterly Rev. Biophys. 21).

Conform relației lui Einstein, coeficientul a_2 definit mai sus din considerente microscopice este folosit pentru a defini un nou parametru macroscopic, coeficientul de difuzie al particulelor difuzante (e.g., ioni permeanți):

$$D = \frac{\left\langle (\Delta x)^2 \right\rangle_x}{2\Delta t} \qquad (16.2)$$

O condiție de bază a teoriei Nernst-Planck este că scala temporală la care se face observarea variabilei x(t) este suficient de "grosieră", încât durata de coliziune a ionilor permeanți în procesul de difuzie devine extrem de mică și poate fi neglijată, iar viteza medie a ionilor, în lipsa oricărei forțe externe, poate fi considerată nulă.

Concentrația stochastică a ionilor permeanți prin canalul ionic în punctul de coordonate (x, t) este descrisă de o funcție de distribuție de probabilitate condițională $P(x, t|x_0, t_0)$, ce exprimă probabilitatea de a găsi un ion la momentul (t) în punctul de coordonată (x), dat fiind că la momentul (t_0) el se află în punctul (x_0). Tratând mișcarea browniană a particulelor difuzante prin canalul ionic ca un proces de tip Markov și presupunând că la momentul inițial (t_0) probabilitatea de a găsi un ion în punctul (x_0) era $P(x_0, t_0)$ (se consideră că difuzia are loc în coordonate uni-dimensionale), expresia lui P(x, t) se poate deduce prin rezolvarea unei ecuații fundamentale în fizica statistică, denumită ecuația master:

$$\frac{\partial P(x,t)}{\partial t} = \int \left\{ W(x \mid x_0) P(x_0,t) - W(x_0 \mid x\ ) P(x\ ,t) \right\} dx_0 \qquad (16.3)$$

unde:

- $W(x|x_0)$ este probabilitatea de tranziție a unei particule, pe unitate de timp, din poziția x_0 în poziția x

- P(x, t) este probabilitatea ca la momentul t particula să se afle în punctul descris de coordonata x

Considerând că particulele difuzante execută mișcarea browniană într-un câmp de forțe electrice, de potențial U(x), precum și al unui gradient de concentrație, se poate demonstra utilizând formalismul lui Langevin (Van Kampen, N. G. 1992. Stochastic processes in physics and chemistry) că parametrul a_1 definit anterior reprezintă tocmai viteza medie (de drift) a ionilor, dată de:

$$a_1(x) = \mu(x) = -\frac{D}{kT}\frac{\partial U(x)}{\partial x} \qquad (16.4)$$

unde semnificația coeficienților este ca în fizica clasică, iar D este valoarea coeficientului de difuzie în porul canalului ionic.

Urmărind un formalism matematic relativ simplu și utilizând niște ipoteze simplifcatoare aplicate ecuației master (vezi mai jos), se găsește că expresia ce descrie variația lui P(x, t)) este soluția unei ecuații stochastice diferențiale de ordinul II, cu derivate parțiale (ecuația Fokker-Planck – care este mai ușor de rezolvat decât ecuația master):

$$\frac{\partial P(x,t)}{\partial t} = -\frac{\partial}{\partial x}\{a_1(x)P(x,t)\} + \frac{1}{2}\frac{\partial^2}{\partial x^2}\{a_2(x)P(x,t)\} \qquad (16.5)$$

sau, cu notațiile de mai sus pentru $a_1(x)$ și $a_2(x)$, se poate scrie în formă echivalentă

$$\frac{\partial P(x,t)}{\partial t} = -\frac{\partial}{\partial x}[\mu(x)P(x,t)] + \frac{\partial^2}{\partial x^2}[DP(x,t)] \qquad (16.6)$$

După cum am subliniat mai sus, ecuația Fokker-Planck reprezintă o particularizare a ecuației master, cu următoarele presupuneri de bază:

- în procesul de mișcare haotică a particulelor difuzante, particulele efectuează salturi mici în spațiu. Notând prin r diferența între coordonata poziției inițiale și finale în cursul unui salt stochastic ($r = x - x_0$) și prin $W(x_0; r)$ probabilitatrea de tranziție efectuată astfel încât, pornind din poziția x_0, lungimea saltului să fie r, afirmația de mai sus se exprimă matematic astfel:

$$W(x_0; r) \sim 0, \text{ pentru } |r| > \delta$$
$$W(x_0 + \Delta x; r) \sim W(x_0; r), \text{ pentru } |\Delta x| < \delta$$

unde δ este un număr pozitiv

BCU IAȘI CENTRALA UNIVERSITARĂ LIBRARY

- soluția ecuației master P(x, t) variază foarte încet cu x, în același înțeles ca și condiția precedentă

Aceasta este o ecuație foarte importantă în descrierea statistică a proceselor stochastice microscopice și costituie fundamentul altor teorii macroscopice de descriere fizică a ansamblelor microscopice (e.g., formula barometrică, distribuția particulelor după energii etc.). Primul termen din partea dreaptă a ecuației Fokker-Planck se numește termen de transport (sau convecție, sau drift) iar cel de-al doilea se numește termen de difuzie.

Utilizând un artificiu matematic, pentru a pune problema analizei procesului de difuzie în termeni macroscopici, măsurabili (parametrul P(x,t) este mai greu de evaluat pentru cazul colecțiilor de particule difuzante), putem face în ecuația de mai sus (16.6) transformarea de variabilă P(x,t) în c(x,t) astfel:

$$c(x,t) = \int c(x_0,t_0)P(x_0,t_0|x,t)dx_0 \qquad (16.7)$$

unde:

- c(x,t) este concentrația ionilor difuzanți, în punctul de coordonată x, la momentul t
- $c(x_0,t)$ este concentrația ionilor difuzanți, în punctul de coordonată x_0, la momentul t_0
- $P(x_0, t_0| x,t)$ este, așa cum a fost definit și mai sus, probabilitatea ca un ion care la momentul t_0 se afla în punctul de coordonată x_0, la momentul t se va afla în punctul de coordonată x

Cu ajutorul relației (16.7), se poate integra ecuația (16.6) pe domeniul tuturor valorilor inițiale posibile (x_0) și se transformă astfel variabila P(x,t) în c(x,t):

$$\frac{\partial c(x,t)}{\partial t} = -\frac{\partial}{\partial x}[\mu(x)c(x,t)] + \frac{\partial^2}{\partial x^2}[Dc(x,t)] \qquad (16.7^*)$$

Utiliând relația între mărimea macroscopică observabilă J(x, t) (denumit flux ionic) și valoarea lui c(x, t), care este dată de ecuația de continuitate:

$$\frac{\partial c(x,t)}{\partial t} = -\frac{\partial J(x,t)}{\partial x} \qquad (16.8)$$

se poate identifica în ecuația Fokker-Planck modificată (16.7*) o mărime macroscopică, măsurabilă, care reprezintă tocmai fluxul de ioni difuzanți prin porul ionic (dat anterior de ecuația Nernst-Planck):

$$J(x) = -D\left[\frac{zq}{kT}\frac{dU(x)}{dx}\right]c(x) - \frac{d}{dx}[Dc(x)] \qquad (16.9)$$

unde:

- zq este sarcina ionilor difuzanţi
- U(x) este potenţialul electric în care are loc mişcarea browniană
- c(x) este concentraţia ionilor difuzanţi

Această ecuaţie a fost dedusă într-un capitol anterior în cadrul unui formalism matematic identic (Einstein – Smoluchowski); ea conduce la o descriere matematică cantitativă completă a mişcării browniene a ionilor prin canale ionice, ce are loc într-un câmp de forţe externe (U(x)) şi sub acţiunea unor forţe de 'frecare' (descrise de D), ce iau naştere din coliziunile aleatorii între particule în procesul de difuzie.

În cazul membranelor biologice, valoarea potenţialului electric (U(x)) în care are loc procesul de difuzie poate căpăta forme analitice complicate, rezultând din următoarele consideraţii:

a. dacă sarcina electrică totală în interiorul porului canalului ionic este nulă (condiţia de electroneutralitate), atunci valoarea câmpului electric E(x) în interiorul membranei este o funcţie liniară cu distanţa în por (x). Prezenţa ionilor difuzanţi, precum şi a altor reziduuri aminoacidice ce constituie parte structurală a porului canalului ionic (având sarcină netă electrică sau caracter dipolar), poate perturba semnificativ valoarea câmpului electric local E(x)

b. prezenţa sarcinilor electrice nete superficiale ale biomembranei complică suplimentar forma funcţiei E(x) la interfaţa soluţie electrolitică – por

În aceste condiţii, pe lângă ecuaţia Nernst-Planck, mai este nevoie şi de o altă ecuaţie (ecuaţia lui Poisson) pentru a rezolva problema difuziei ionice prin canalul ionic:

$$div\vec{E}(x)=\frac{\rho(x)}{\varepsilon_0}$$
$$\rho(x)=F\sum_k(z_{+k}C_{+k}(x)+z_{-k}C_{-k}(x))+F\sum_i z_iC_i(x)+q_{indus}(x) \qquad (16.10)$$

unde:

- ε_0 este permitivitatea electrică a vidului
- $C_{+k}(x)$, z_{+k} sunt concentraţia, respectiv valenţa ionilor permeanţi pozitivi la distanţa (x) în canalul ionic (analog pentru ionii negativi)
- $C_i(x)$ reprezintă contribuţia speciei ionice (i) a porului permeant (i.e., ce rezidă în structura electrică a aminoacizilor ce formează porul permeant) la densitatea de sarcină totală
- $q_{indus}(x)$ se referă la sarcina electrică indusă, prin procese de polarizare electrică la interfaţa între două medii cu permitivităţi electrice diferite, de către speciile ionice permeante în structura porului permeant

BCU CLUJ CENTRALA UNIVERSITARĂ LIBRARY

- F este constanta lui Faraday

Ecuația lui Nernst-Planck împreună cu ecuația lui Poisson formează un sistem integrat de ecuații diferențiale cuplate (ecuațiile Nernst-Planck-Poisson). Rezolvarea acestui sistem de ecuații cu condiții la limită cunoscute (e.g., distribuția de sarcină electrică în porul canalului ionic, cunoașterea topologiei canalului ionic) conduce la determinarea soluției unice a fluxului ionic prin canale ionice (laboratorul condus de R.S. Eisenberg).

16.2. *Ecuația lui Langevin*

Modelarea moleculară browniană a dinamicii ionilor prin por, utilizând ecuația lui Langevin, reprezintă o altă modalitate de a studia mișcarea browniană a ionilor difuzanți printr-un canal ionic. Ipoteza esențială a ecuației lui Langevin este că scala temporală de observație a mărimii x(t) este suficient de 'fină', încât viteza medie a unui ion în procesul de permeație să fie nenulă. În acest caz, fluctuațiile în coordonată și viteză ale unei singure particule (ion) difuzante sunt introduse prin adăugarea unui termen aleator, denumit și sursă de zgomot, la ecuația de mișcare a particulei:

$$m\frac{d\vec{v}}{dt} = -m\beta\vec{v} + \vec{F} + \vec{L}(t) \qquad (16.11)$$

unde:

- m este masa ionului difuzant
- β este numeric egal cu γ/m, iar γ reprezintă factorul de frecare ce intră în expresia forței de frecare (F_f) ce se exercită asupra particulei difuzante în cursul mișcării browniene, datorită interacțiunii cu celelalte particule (la viteze de fluctuație mici, $F_f = -\gamma v$)
- F este forța externă (electrică, gravitațională etc) ce se exercită asupra unui ion difuzant
- L(t) este forța stochastică ce se exercită asupra unui ion difuzant și este cauzată de coliziunile aleatorii cu ceilalți ioni

Cu toate că o expresie analitică a lui L(t) este imposibil de determinat, această forță stochastică are următoarele proprietăți:

$$\langle L(t)\rangle = 0$$
$$\langle L(t)L(t')\rangle = \Gamma\delta(t-t') \qquad (16.12)$$

BCU IAȘI - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

unde Γ este o constantă.

Altfel spus, coliziunile între particula difuzantă şi oricare altă particulă din mediul de difuzie sunt procese practic instantanee, iar două ciocniri consecutive sunt necorelate. În anumite cazuri, pentru simplificarea evaluării ecuaţiei (16.11), se consideră că funcţia L(t) derivă dintr-un proces Gaussian.

Considerând că mişcarea are loc unidimensional, ecuaţia de mişcare de mai sus face parte din clasa ecuaţiilor diferenţiale ordinare neomogene, de ordinul I, şi are soluţia:

$$v(t)-v(0)e^{-\beta^* t}-\frac{\frac{F(0)}{m\beta}}{(1-e^{-\beta^* t})}=\left(\frac{1}{m}\right)\int_0^t (e^{-\beta^*(t-t')}L(t(0)+t')dt' \qquad (16.13)$$

unde v(0) reprezintă valoarea vitezei iniţiale a ionului (la momentul t(0)) iar F(0) este valoarea forţei externe ce se exercită asupra ionului la acelaşi moment iniţial. În urma unor calcule relativ simple, în cadrul formalismului de mai sus, se poate deduce că expresia probabilităţii ca la momentul t particula se va afla în punctul de coordonată x (ştiind că la momentul $t_0 = 0$ ea se afla în punctul $x_0 = 0$) este dată de (Statistical Physics, 1991. Kubo, R., Toda, M., Hashitsume, N):

$$P(0,0|x,t)=\left[4\pi D\left(t-\frac{1-e^{-\gamma t}}{\gamma}\right)\right]^{-1/2} e^{\left\{-x^2\left[4D\left(t-\frac{1-e^{-\gamma t}}{\gamma}\right)\right]^{-1}\right\}} \qquad (16.13^*)$$

În ultimii ani au fost dezvoltate mai multe programe de computer (e.g., CHANSIM, AMBER, GROMOS, CHARMM) ce ajută la rezolvarea automată a ecuaţiei de mai sus, iar rezultatele simulării moleculare dinamice ajută la descrierea cantitativă a coordonatei ionului prin porul canalului ionic, a fluxului ionic printr-un canal ionic sau permeabilităţii relative a unui canal ionic pentru o anumită specie ionică (laboratorul condus de M. Karplus). În contradicţie cu avantajele oferite de această abordare a proceselor de difuzie în canale ionice (e.g., abilitatea de a descrie cu acurateţe interacţiunile dintre canalul ionic şi ionul permeant, procesele de interacţiune ion-ion în procesul de difuzie), se pare că cel mai mare inconvenient al acestei tehnici îl reprezintă timpul mare de calcul necesar pentru a rula programele amintite mai sus. Astfel, în cazul modelării difuziei prin receptorul de acetilcolină (S. H. Chung, 1998), o simulare în timp real cu pasul de timp egal cu 1 μs a necesitat 18 ore de timp de procesare pe un supercalculator. Trebuie menţionat că metoda Langevin de studiere a proceselor de permeaţie ionică prin canale ionice conferă o imagine mai detaliată despre comportamentul stochastic al ionilor permeanţi în canalul ionic, deoarece el este studiat la o scară de timp mai redusă decât în cazul tratamentului Fokker-Planck.

16.3. *Teoria lui Eyring*

În abordarea lui Eyring (propusă de H. Eyring încă din anul 1949 şi continuată de alți autori în deceniile următoare – P. Lauger în 1973, B. Hille în 1975, C. Miller în 1980 etc.), se presupune că permeația ionilor prin canale ionice are loc ca o mişcare ordonată, în continua interacțiune cu un domeniu cu o anumită structură a energiei potențiale. Acest profil de energie potențială este constituit din maxime energetice, corespunzătoare stărilor de tranziție ale complexelor moleculare canal ionic – ion difuzant, şi minime energetice ce corespund situsurilor de legătură dintre ion şi porul canalului ionic. Spre deosebire de cazul teoriei Nernst-Planck, în care procesul de difuzie ionică era considerat ca fiind unul 'spațial-fluid' (continuu), difuzia ionică în cadrul teoriei lui Eyring este imaginată ca o serie de 'salturi' ale ionului permeant dintr-un minim energetic într-altul, 'alimentate' energetic de energia termală din mediul înconjurător. În cadrul acestui model, se neglijează frecările dintre ionii permeanți şi mediul de difuzie – după cum au fost descrise anterior.

În figura 102 este reprezentată schematic diagrama energetică a porului prin care difuzează ionii permeanți, iar semnificația notațiilor este următoarea:

- c_1, c_2, ... c_n sunt concentrațiile speciei ionice permeante în situsurile de legătură, ce corespund valorilor energetice de potențial minime de pe diagrama energetică corespunzătoare

- ΔG_1, ΔG_2, ... ΔG_n sunt valorile celor n bariere energetice considerate (e-

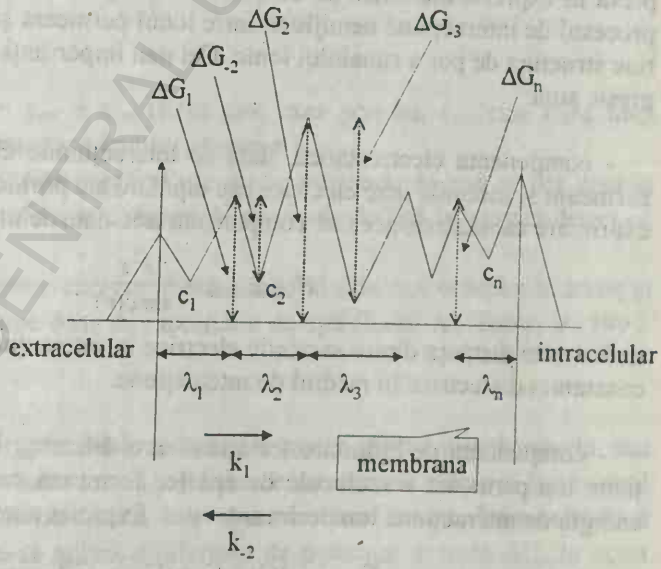


Fig. 102. Reprezentarea diagramei energetice (a profilului de energie potențială) a porului permeant al unui canal ionic în cadrul modelului Eyring

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

nergie liberă), date de interacţiunea canal ionic – ion permeant, pe care ionii trebuie să le surmonteze în procesul de difuzie. Aceste valori sunt calculate în raport cu starea total hidratată a ionilor din soluţiile apoase în mediile intracelular şi cel extracelular, unde G se consideră egal cu zero

- ΔG_{-2} este diferenţa între primul maxim energetic şi minimul energetic imediat următor (raţionament analog pentru toţi ΔG_{-n})

- $\lambda_1, \lambda_2, \ldots \lambda_n$ reprezintă distanţele geometrice între maxime energetice succesive

- k_1, k_{-2} reprezintă ratele de tranziţie ale ionului difuzant peste primul maxim energetic din structura de por a canalului ionic (notaţii analoage pentru celelalte maxime energetice)

În diagrama schematizată în Fig. 102, profilul energetic - descris simplificat prin linii - ce corespunde variaţiei energiei libere de interacţiune a sistemului por – ion permeant, cu maximele şi minimele corespunzătoare, poate fi foarte complexă în expresie analitică; ea conţine mai mulţi termeni energetici, ce apar din procesul de interacţiune nemijlocit între ionul permeant şi aminoacizii ce constituie structura de por a canalului ionic. Cei mai importanţi termeni din această expresie sunt:

- componenta electrostatică, dată de interacţiunile electrostatice între ionul permeant şi sarcinile nete electrice sau dipolare ale porului canalului ionic. Într-o exprimare cantitativă, această componentă este dată de următoarea expresie:

$$H_{electrostatic} = \frac{e^2 z}{4\pi \cdot \varepsilon(r)} \qquad (16.14)$$

unde r este distanţa dintre sarcinile electrice în interacţiune iar ε(r) este valoarea constantei dielectrice în mediul de interacţiune.

- componenta de hidratare, ce apare ca o diferenţă între energia de interacţiune ion permeant – molecule de apă (ce formează complexul ion hidratat) şi energia de interacţiune ion permeant – por. Expresia acestui termen este dat de:

$$G_{hidratare}(\Omega) = G_i + (G_{i+1} - G_i)\frac{\Omega - \Omega_i}{\Omega_{i+1} - \Omega_i} \qquad (16.15)$$

unde:

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

$$\Omega = \begin{cases} 1, \Gamma - r > \rho; \\ 1 - \sqrt{1 - \left(\dfrac{\Gamma + r}{\rho}\right)^2} + \dfrac{1}{\pi} \displaystyle\int_{\Gamma - \frac{r}{\rho}}^{\Gamma + \frac{r}{\rho}} \frac{t}{\sqrt{1 - t^2}} \arccos\left(\frac{\Gamma^2 - r^2 - \rho^2 t^2}{2r\rho t}\right) dt, \Gamma - r < \rho, \\ \Gamma + r < \rho, \Gamma > r; \\ \dfrac{1}{\pi} \displaystyle\int_{\Gamma - \frac{r}{\rho}}^{\Gamma + \frac{r}{\rho}} \frac{t}{\sqrt{1 - t^2}} \arccos\left(\frac{-\Gamma^2 + r^2 + \rho^2 t^2}{2r\rho t}\right) dt, \Gamma - r < \rho, \\ \Gamma + r < \rho, \Gamma < r; \\ \dfrac{1}{\pi} \displaystyle\int_{\Gamma - \frac{r}{\rho}}^{1} \frac{t}{\sqrt{1 - t^2}} \arccos\left(\frac{\Gamma^2 - r^2 - \rho^2 t^2}{2r\rho t}\right) dt, \Gamma - r < \rho, \\ \Gamma + r > \rho, \Gamma > r; \\ 1 - \dfrac{1}{\pi} \displaystyle\int_{\Gamma - \frac{r}{\rho}}^{\Gamma + \frac{r}{\rho}} \frac{t}{\sqrt{1 - t^2}} \arccos\left(\frac{-\Gamma^2 + r^2 + \rho^2 t^2}{2r\rho t}\right) dt, \Gamma - r < \rho, \\ \Gamma + r > \rho, \Gamma < r \end{cases}$$

iar:

- $\Gamma = R(x) - r_{apa}$, $\rho = r_{apa} + r_{ion}$ ($R(x)$ este raza porului, r_{apa} este raza unei molecule de apă și r_{ion} este raza ionului permeant);

- $\Omega_i = i - 2/n_c - 2$ (n_c este numărul maxim de molecule de apă ce pot veni în contact cu ionul și i se referă la numărul de molecule de apă în contact direct cu ionul);

- G_i este diferența dintre energia liberă a ionului difuzant complet hidratat și când el este în interacțiune doar cu i molecule de apă (Laio, A., Torre, V. 1999. Biophysical J. 76).

Singurul termen energetic suplimentar care poate apărea în schema de mai sus, în procesul de permeație ionică, este cel de interacțiune electrică între ionul permeant și un câmp electric extern, cum apare în cazul în care între cele două medii ale biomembranei se aplică o diferență de potențial externă ΔU. În acest caz, în locația corespunzătoare minimului energetic (c_1), valoarea energiei libere a ionului permeant (G_{c1}) este dată de:

BCU / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

$$G_{c1} = G_{electrostatic(c1)} + H_{hidratare(c1)} + ze\Delta U \frac{x_{c1}}{d} \qquad (16.16)$$

unde $ze\Delta U \frac{x_{c1}}{d}$ reprezintă energia de interacţiune a ionului permeant (cu sarcină ze) cu un câmp electric membranar, a cărui valoare în locaţia c_1 (situată la distanţa x_{c1} de mediul extracelular) este $U \frac{x_{c1}}{d}$ iar semnificaţia celorlalţi termeni este ca mai sus (d este grosimea membranei).

Locaţiile geometrice din schema de mai sus corespunzătoare minimelor energetice reprezintă situsuri în care afinitatea energetică a porului permeant pentru ionii permeanţi este cea mai mare (poziţii în care ionii permeanţi interacţionează cel mai favorabil cu porul canalului ionic). În aceste situsuri, valoarea energiei de interacţiune a canalului ionic cu ionul permenat ($H_{electrostatic} + G_{hidratare}$) este cea mai mare în valori negative (deci reprezintă locaţii de echilibru stabil pentru ionii permeanţi). Situsurile topologice corespunzătoare maximelor energetice (în valori pozitive – 'peak'-uri) din schema de permeaţie de mai sus pot fi asimilate cu regiuni din structura porului unde interacţiunea canal ionic – ion permeant devine puţin mai 'ne-favorabilă' energetic, în comparaţie cu cazurile precedente. Trebuie subliniat că aceste maxime energetice, ce constituie bariere de potenţial pentru difuzia ionilor permeanţi, nu sunt mai mari decât ~ 5kT: chiar şi aici, interacţiunea canal ionic – ion permeant este favorabilă energetic, însă mai puţin în comparaţie cu situaţia precedentă (i.e., minimele energetice), dacă nu ar fi aşa (i.e., în aceste locaţii $|G_{hidratare}| >>> |H_{electrostatic}|$), un ion ar trebui să devină complet dehidratat la saltul peste o asemenea barieră de energie. Aceasta ar face ca energia de activare a ionului ($G_{peak} - G_{minim}$) la difuzia peste o barieră energetică să fie prohibitiv de mare şi deci curentul electric mediat de canalul ionic ar deveni insignificant pentru asigurarea îndeplinirii funcţiilor biofizice ale biomembranelor.

Trebuie menţionat că locaţia fizică din profilului energetic al porului unde componenta de hidratare devine dominantă este în filtrul de selectivitate al canalului ionic; acesta reprezintă domeniul structural al porului ce realizează discriminarea energetică între diferiţi ioni permeanţi. În procesul de permeaţie prin canale ionice, există două metode prin care se realizează selecţia unor ioni difuzanţi în raport cu alţii:

a. selecţia sterică, bazată pe considerente geometrice; raza de hidratare a ionului de potasiu este mai mare decât cea a ionului de sodiu. În acest fel, ionii de potasiu sunt excluşi de la difuzia prin canale de sodiu;

b. selecția energetică, ce are loc în zona filtrului de selectivitate. Chiar dacă raza de hidratare a ionilor de sodiu este mai mică decât a celor de potasiu, ei sunt excluși în mare parte de la difuzia prin canale ionice de potasiu, deoarece energia de hidratare a ionilor de sodiu este mult mai mare decât energia lor de interacție cu aminoacizii din filtrul de selectivitate. În acest fel, ionii de sodiu (hidratați) nu pot 'pierde' moleculele de apă din prima zonă de hidratare prin interacțiuni electrostatice complementare cu filtrul de selectivitate, și deci dimensiunile lor (hidratate) nu permit difuzia prin zona filtrului de selectivitate (din considerente de stericitate – ionii de sodiu hidratați au raza mai mare decât ionii de potasiu nehidratați). Ionii de potasiu hidratați (cu energie de hidratare mai mică decât a ionilor de sodiu) sunt ușor dehidratabili în zona filtrului de selectivitate, și deci devin permeanți prin canalul ionic. În cazul canalului ionic de potasiu (KcsA) din bacteria *Streptomyces lividans*, filtrul de selectivitate are un diametru de ~ 3 Å, permițând accesul doar al unui ion de potasiu total de-hidratat. Din punct de vedere molecular, acest filtru de selectivitate este constituit din 4-5 atomi de oxigen de la resturile carbonil ale aminoacizilor TVGYG (R. MacKinnon și colaboratorii, 1998), de la fiecare din cei patru monomeri ai canalului ionic și care provin din domeniul proteic P (vezi mai sus). Deoarece legăturile chimice ce conțin acești atomi de oxigen sunt inflexibile, aceasta conferă grad sporit de selectivitate acestui canal ionic; într-o exprimare echivalentă, se poate aprecia că lungimea acestor legături nu este ușor alterabilă, așa cum s-ar întâmpla dacă și alți ioni, cu rază mai mare, ar putea să difuzeze prin canalul ionic.

În procesul de permeație, ionul permeant difuzează din mediul extracelular (de exemplu) în prima locație energetică cea mai favorabilă (i.e., primul minim energetic) din structura porului. În acest fel, ionul a 'pierdut' câteva din moleculele de apă de hidratare, iar interacțiunea sa electrostatică cu grupări aminoacidice din porul permeant favorizează starea energetică stabilă a acestuia. În mod fizic similar, el difuzează peste toate barierele energetice: în locația cu bariera energetică maximă (i.e. filtrul de selectivitate), ionul devine complet dehidratat și interacționează astfel doar cu aminoacizi ce compun acest 'filtru' ionic. Mai departe (în procesul de difuzie), ionul devine parțial hidratat, până la eliberarea sa în mediul intracelular unde redevine total hidratat.

În cadrul modelului prezentat mai sus, fluxul mediu net de ioni permeanți peste bariera energetică i (Fig. 102) este dat de:

$$J = k_i c_i \lambda_i - k_{-(i+1)} c_{i+1} \lambda_{i+1} \qquad (16.17)$$

iar

$$k_i = \frac{kT}{h} e^{-\frac{\Delta G_i}{RT}} \qquad (16.18)$$

(s-a considerat că aria secţiunii transversale a porului este constantă pe toată lungimea sa şi egală cu unitatea). Parametrii k_i au semnificaţia unor constante de reacţie.

În condiţii de staţionaritate, fluxul J este acelaşi pentru fiecare barieră energetică:

$$\begin{aligned} J &= k_1 c_1 \lambda_1 - k_{-2} c_2 \lambda_2 \\ J &= k_2 c_2 \lambda_2 - k_{-3} c_3 \lambda_3 \\ J &= k_{n-1} c_{n-1} \lambda_{n-1} - k_{-n} c_n \lambda_n \end{aligned} \qquad (16.19)$$

Eliminând din sistemul de ecuaţii de mai sus valorile intermediare ale lui $c_i\lambda_i$ şi procedând la operaţii algebrice simple, rezultă următoarea expresie pentru valoarea fluxului ionic prin porul conductiv:

$$J = \frac{\lambda_1 k_1 \left[c_1 - \left(\frac{\lambda_n}{\lambda_1} \right) \left\{ e^{\frac{\Delta G^n}{RT}} \right\} c_n \right]}{1 + e^{\frac{\delta G_2}{RT}} + e^{\frac{\delta G_3}{RT}} + \ldots e^{\frac{\delta G_{n-1}}{RT}}} \qquad (16.20)$$

unde:

- ΔG^n este diferenţa între energia liberă a situsului 1 şi n;
- δG_n este diferenţa între maximele energetice ale barierelor 1 şi n.

În ciuda expresiei relativ complicate, relaţia de mai sus poate fi uşor adaptată pentru modele de permeaţie simplificate (e.g., cu un număr finit de bariere energetice, bariere energetice identice, modele în care doar un singur ion poate fi localizat într-un situs de legătură la un moment dat etc.). Corelând datele experimentale din experimente de 'patch-clamp' cu rezultatele unor astfel de modele de permeaţie, se pot imagina diferite structuri energetice ale porului permeant, cu posibile reflectări în realitate, verificabile prin procedee de electrofiziologie moleculară şi mutageneză.

Fiecare din modelele de permeaţie prezentate mai sus furnizează informaţii utile despre mecanismele proceselor **reale** de difuzie prin canale ionice. Cu toate acestea, este incorect să afirmăm că **doar unul** din modelele descrise prezintă realitatea fizică asimilată acestor procese; ele nu reprezintă decât aproximaţii grosiere ale acestor fenomene. Este în sarcina experimentelor viitoare de biofizică moleculară, mutageneză şi modelare moleculară să decidă caracterul de generalitate al unui model de permeaţie particular prin canale ionice.

17. Metoda fluctuațiilor de curent în analiza proprietăților electrice ale biomembranelor

După cum a fost menționat și în alte capitole, proprietățile electrice ale biomembranelor își datorează specificitatea canalelor ionice inserate în structura lor bilipidică și aceste canale ionice reprezintă fundamentul structural principal al determinării funcțiilor biomembranelor.

Valoarea densității de canale ionice voltaj-dependente variază apreciabil de la un țesut la altul; în tabelul următor sunt prezentate valori ale densităților de canale ionice voltaj-dependente de sodiu și potasiu în diferite țesuturi biologice:

Tabel 12. Densitatea de canale ionice voltaj-dependente de sodiu și potasiu în diferite țesuturi biologice

Țesut	Densitate de canale ionice (număr de canale/μm^2)
Canale ionice de sodiu voltaj-dependente	
Axon de calmar	300
Nod Ranvier de broască	3.000
Ventricul de șobolan	43
Nod Ranvier de șobolan	2.100
Canale ionice de potasiu voltaj-dependente	
Axon de calmar	30
Nod Ranvier de broască	~ 600
Mușchi scheletic de broască	110
Neuroni de melci	7

Am subliniat într-un capitol precedent că, molecular, aceste canale ionice fluctuează stochastic între diferite stări microscopice, asociate macroscopic cu diferite valori ale conductivității electrice. Din acest motiv, tehnicile macroscopice de măsurare a curenților prin biomembrane sau a diferențelor de potențial transmembranar reflectă valori medii ale mărimilor măsurate, în care cantitățile mediate sunt parametrii electrici corespunzători ai canalelor ionice individuale (vezi capitolele anterioare).

Metoda analizei fluctuațiilor de curent prin biomembrane este concepută și utilizată pentru a se deduce informații despre proprietățile microscopice ale canalelor ionice (e.g., conductanța electrică, proprietăți de 'gating', etc.), având

ca subiect de analiză cantităţi măsurabile macroscopice (e.g., curenţii electrici medii, diferenţe de potenţial transmembranare medii etc.).

Ideea fundamentală a acestei metode este că aceleaşi proprietăţi moleculare care guvernează comportamentul stochastic, microscopic al canalelor ionice, sunt responsabile şi pentru manifestarea macroscopică a mărimilor fizice asociate cu acel comportament molecular, individual (e.g., aceleaşi proprietăţi microscopice sunt responsabile şi pentru valorile medii ale curenţilor electrici mediaţi de un canal ionic, şi pentru fluctuaţiile curentului electric în jurul acelor valori medii) (vezi figura de mai jos).

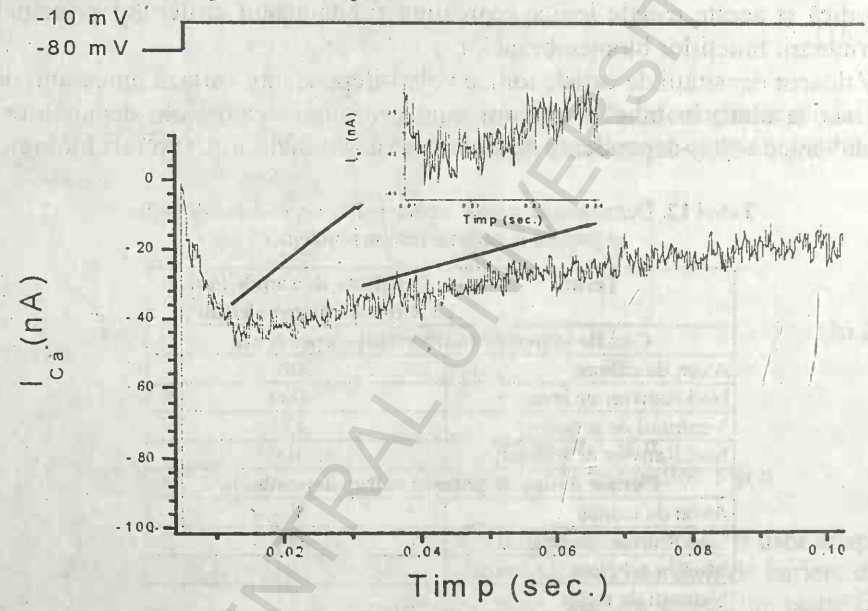


Fig 103. Ilustrarea existenţei fluctuaţiilor de curent ionic ce se suprapun peste componenta macroscopică a curentului electric mediat de o populaţie de canale ionice voltaj-dependente de calciu. Activarea canalelor ionice s-a făcut prin modificarea în 'treaptă' a diferenţei de potenţial membranar de la valoarea de –80 mV la –10 mV (*Tudor Luchian, rezultate nepublicate*)

După cum a fost prezentat anterior, în biofizica moleculară modernă, pentru a răspunde la întrebări fundamentale despre proprietăţi de structură şi cinetică a canalelor ionice, se utilizează tehnica 'patch-clamp' care permite studierea şi analiza cantitativă a proprietăţilor unui singur canal ionic dintr-o biomembrană. Până la dezvoltarea tehnologică şi conceptuală care a permis implementarea tehnicii 'patch-clamp', tehnica analizei fluctuaţiilor de curent ('current-noise') a fost singura metodă fizică de evaluare a proprietăţilor microscopice ale canalelor

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

ionice menționate mai sus (vezi F. Conti – 1975, A.A. Verveen – 1966, L. J. DeFelice – 1975).

Datorită robusteții și eficienței sale, mai este folosită încă și astăzi pe scară largă în studiile de biofizică moleculară.

Înainte de a prezenta conceptele fizice și matematice care stau la baza implementării acestei tehnici, vor fi prezentate câteva noțiuni matematice elementare de analiză a semnalelor temporale.

Pentru un semnal stochastic și considerat ergotic (X(t)), valoarea sa medie pe o durată temporală de la 0 la T este dată de formula:

$$\langle X(t)\rangle = \overline{X(t)} = \frac{1}{T}\int_0^T X(t)dt \qquad (17.1)$$

Valoarea medie a pătratului lui X(t) pe aceași durată temporală este dată de:

$$\langle X^2(t)\rangle = \frac{1}{T}\int_0^T X^2(t)dt \qquad (17.2)$$

Pe toata durata de la 0 la T, varianța semnalului X(t) este dată de:

$$\sigma^2 = \left\langle X^2(t) - \langle X(t)\rangle\right\rangle^2 \qquad (17.3)$$

Pe de altă parte, orice semnal X(t) poate fi descompus în serii de puteri Fourier:

$$X(t) = a_0 + \sum_{n=1}^{\infty} a_n \cos(n\omega t) + b_n \sin(n\omega t)$$

unde :

$$a_0 = \frac{1}{T}\int_0^T X(t)dt$$

$$a_n = \frac{2}{T}\int_0^T X(t)\cos(n\omega t)dt \qquad (17.4)$$

$$b_n = \frac{2}{T}\int_0^T X(t)\sin(n\omega t)dt$$

$$\omega = \frac{2\pi}{T}$$

Alternativ, transformarea Fourier a unui semnal X(t) poate fi scrisă astfel:

$$X(t) = \frac{1}{2\pi}\int_{-\infty}^{\infty} X(\omega)e^{j\omega t}d\omega \qquad (17.5)$$

Transformarea Fourier inversă a unui semnal X(ω) este definită astfel:

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

$$X(\omega) = \int_{-\infty}^{\infty} X(t) e^{-j\omega t} dt \tag{17.6}$$

Pentru orice funcţie X(t), este adevărată următoarea relaţie (teorema lui Rayleigh):

$$\int_{-\infty}^{\infty} |X(t)|^2 dt = \int_{-\infty}^{\infty} |X(f)|^2 df \tag{17.7}$$

(f = 1/T)

Aşadar, pentru un semnal real X(t) (care există între 0 şi T), egalitatea de mai sus devine:

$$\int_{0}^{T} |X(t)|^2 dt = \int_{-\infty}^{\infty} |X(f)|^2 df \tag{17.8}$$

Dacă valoarea medie a lui X(t) este zero pe intervalul de timp considerat, expresia variaţiei sale este dată de:

$$\sigma^2 = \frac{1}{T} \int_{0}^{T} X^2(t) dt = \frac{2}{T} \int_{0}^{\infty} |X(f)|^2 df \tag{17.9}$$

(în deducerea relaţiei de mai sus, s-a utilizat teorema lui Rayleigh).

Densitatea spectrală a semnalului X(t) este evidenţiată în relaţia:

$$\hat{S}(f) = \frac{2}{T} |X(f)|^2 \tag{17.10}$$

Deci, pentru semnalul X(t) considerat în particular (cu media pe intervalul de la 0 la T nulă), valoarea varianţei este dată de:

$$\sigma^2 = \int_{0}^{\infty} \hat{S}(f) df \tag{17.11}$$

Dacă definim funcţia de autocorelaţie a semnalului X(t) (pe domeniul de la 0 la T) prin:

$$C(\tau) = \lim_{T \to \infty} \frac{1}{2T} \int_{-T}^{T} X(t) X(t+\tau) dt \tag{17.12}$$

următoarea relaţie (teorema Wiener-Khintchine) este adevărată:

$$\hat{S}(f) = 4 \int_{0}^{\infty} C(\tau) \cos(\omega\tau) d\tau \tag{17.13}$$

Poate că este util de menţionat aici că funcţia de autocorelaţie a unui semnal, cum este definită mai sus, dă o estimare a gradului de asemănare a unui semnal cu el însuşi, după orice timp τ: cu cât valoarea funcţiei de autocorelaţie la

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

momentul τ este mai mare, cu atât este mai posibilă prezicerea corectă a valorii lui $X(\tau)$, știind că la $t = 0$ valoarea semnalului este $X(0)$. Pentru a exemplifica modul practic de implementare a tehnicii de analiză 'current-noise', vom considera modelul simplificat al unei membrane biologice care are un număr total de canale ionice identice și independente.

A fost precizat într-un capitol anterior că cea mai simplă schemă cinetică a unui canal ionic individual este cea în care el efectuează tranziții stochastice între două stări conductive distincte:

$$'inchis' \underset{\beta}{\overset{\alpha}{\Leftrightarrow}} 'deschis' \tag{17.14}$$

Utilizând conceptele statistice dezvoltate într-un subcapitol anterior, putem scrie că, în valori probabile, cinetica populației de N canale ionice poate fi descrisă astfel:

$$N_c \underset{\beta}{\overset{\alpha}{\Leftrightarrow}} N_o \tag{17.15}$$

unde:

- N_c reprezintă numărul *probabil* de canale ionice aflate în starea 'închis' ('closed') la momentul t
- N_o reprezintă numărul *probabil* de canale ionice aflate în starea 'deschis' ('open') la momentul t
- $N_o + N_c = N$ (la orice moment t)

În termeni cantitativi, putem rescrie reacția de mai sus astfel:

$$\frac{dN_c(t)}{dt} = \beta N_o(t) - \alpha N_c(t)$$

$$sau \tag{17.16}$$

$$\frac{dN_o(t)}{dt} = \alpha N_c(t) - \beta N_o(t)$$

Dacă notăm prin $N_o(0)$ și $N_o(\infty)$, numerele probabile de canale ionice aflate în starea 'deschis' la momentul inițial, înaintea unei perturbații ale ratelor de tranziție α și βcând populația de canale ionice era în stare de echilibru, și respectiv final, după realizarea unei perturbații a ratelor de tranziție α și βcând populația de canale ionice atinge o altă stare de echilibru, variația temporală a numărului probabil de canale ionice aflate în starea 'deschis' după realizarea perturbației este dată de soluția ecuației de mai sus scrisă astfel:

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

$$N_o(t) = N_o(0)e^{-\frac{t}{\theta}} + N_o(\infty)\left(1 - e^{-\frac{t}{\theta}}\right) \tag{17.17}$$

unde:

- $\theta = \frac{1}{\alpha + \beta}$

În ceea ce priveşte interpretarea acestei ecuaţii, trebuie subliniat iarăşi că $N_o(t)$ **nu** reprezintă numărul **exact** de canale ionice din starea 'deschis' la momentul t, ci doar valoarea probabilă a acestui număr. De exemplu, chiar dacă pentru $t \to \infty$ (în noua stare de echilibru) numărul probabil de canale ionice din starea 'deschis' va fi constant, numărul exact de canale ionice din starea 'deschis' vizibil la amplificări mai mari ale cantităţii măsurate - va fluctua continuu în jurul valorii lui $N_o(\infty)$ (vezi Fig. 103)

Din punct de vedere electric, procesul de închidere şi deschidere al unui singur canal ionic din populaţia considerată va fi reprezentat ca o serie temporală de curenţi electrici i(t), în care valorile măsurate ale curentului electric individual sunt fie zero, fie o valoare finită a (valoare maximă), când canalul este în starea 'deschis'.

Din relaţiile de mai sus, se poate verifica faptul că la echilibru, relaţia ce dă probabilitatea de a găsi un canal ionic în starea deschis (p_o) este:

$$p_o = \frac{\alpha}{\alpha + \beta} \tag{17.18}$$

Valoarea medie a mărimii i(t), considerată mărime fizică stochastică şi ergotică, pe intervalul de timp de la 0 la T, este reprezentată de:

$$\langle i(t) \rangle = \frac{1}{T}\int_0^T i(t)dt = a\frac{\alpha}{\alpha + \beta} \tag{17.19}$$

Cu aceste notaţii, funcţia de autocorelaţie a mărimii i(t) este:

$$C(\tau) = \lim_{T\to\infty} \frac{1}{2T}\int_{-T}^{T} \Big(i(t) - \langle i(t)\rangle\Big)\Big(i(t+\tau) - \langle i(t)\rangle\Big)dt$$

sau

$$C(\tau) = \lim_{T\to\infty} \frac{1}{2T}\int_{-T}^{T} \Big(i(t)i(t+\tau) - \langle i(t)\rangle^2\Big)dt \tag{17.20}$$

Dar:

BCUIASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

$$\lim_{t\to\infty}\frac{1}{2T}\int_{-t}^{T} i(t)i(t+\tau)dt = a^2\frac{\alpha}{\alpha+\beta}p_0(\tau) \qquad (17.21)$$

Din relațiile scrise mai sus, se poate arăta că:

$$p_o(\tau) = \frac{\alpha}{\alpha+\beta} + \left(\frac{\beta}{\alpha+\beta}\right)e^{-\frac{\tau}{\theta}} \qquad (17.22)$$

Cu aceste relații, deducem că:

$$C(\tau) = a^2\frac{\alpha}{\alpha+\beta}\left[\frac{\alpha}{\alpha+\beta} + \frac{\beta}{\alpha+\beta}e^{-\frac{\tau}{\theta}}\right] - \left(a\frac{\alpha}{\alpha+\beta}\right)^2 \qquad (17.23)$$

sau simplificat:

$$C(\tau) = \frac{\alpha\beta}{\alpha+\beta}a^2e^{-\frac{\tau}{\theta}} \qquad (17.24)$$

Notând cu:

$$1-p(o) = p(c) = \frac{\beta}{\alpha+\beta} \qquad (17.25)$$

unde p(c) este probabilitatea de a găsi canalul ionic în starea 'închis' în condiții de echilibru,

putem scrie:

$$C(\tau) = p(o)(1-p(o)\gamma^2(V-V_{Nerst})^2e^{-\frac{\tau}{\theta}} \qquad (17.26)$$

unde:

- γ este conductivitatea electrică a unui canal ionic în condițiile experimentale date
- V este diferența de potențial aplicată din exterior canalului ionic
- V_{Nernst} este potențialul Nernstian al canalului ionic studiat

Deoarece numărul de N canale ionice studiate sunt independente, rezultă imediat că funcția de autocorelație a fluctuațiilor de curent macroscopic înregistrat este dată de:

$$C_{macroscopic}(\tau) = Np(o)(1-p(o)\gamma^2(V-V_{Nerst})^2e^{-\frac{\tau}{\theta}} \qquad (17.27)$$

Utilizând teorema lui Wiener-Khintchine, rezultă că funcția de putere spectrală ('power - spectrum') a fluctuațiilor curentului macroscopic înregistrat este dată de o funcție tip Lorenz:

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

$$\hat{S}(f) = \frac{4\gamma^2 p(o)(1-p(o)(V-V_{Nernst})^2\theta}{1+\omega^2\theta^2} \qquad (17.28)$$

Reprezentat grafic, un asemenea 'power-spectrum' arată astfel:

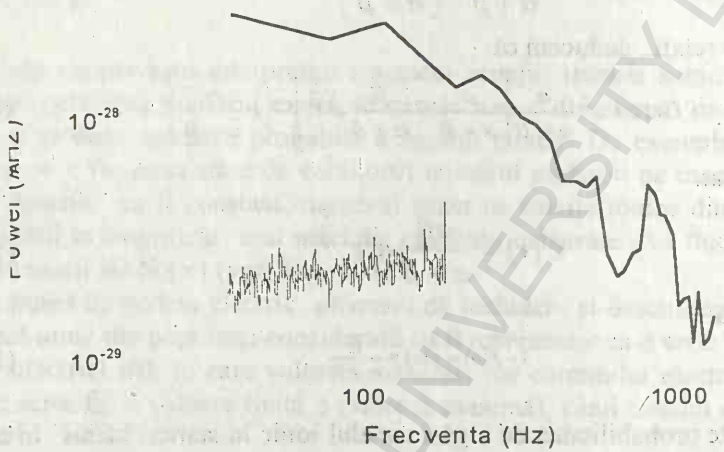


Fig. 104. Descompunerea spectrală în serii de puteri (*'power spectrum'*) a fluctuațiilor de curent ionic (arătate în inset) mediate de un canal ionic, în condiții de staționaritate (*Tudor Luchian, rezultate nepublicate*)

Prin fitarea experimentală a unui asemenea grafic cu o funcție de tipul celei deduse mai sus ($\hat{S}(f)$ - tip Lorenz), se pot deduce două informații esențiale ce ajută la caracterizarea proprietăților unui canal ionic singular:

1. Se știe că, pentru o populație de canale ionice din exemplul considerat mai sus, varianța fluctuațiilor de curent macroscopic în jurul valorii medii I înregistrate este dată de:

$$\sigma_I^2 = p(o)(P(o)-1)Ni^2$$
$$unde: \qquad (17.29)$$
$$I = p(o)Ni$$

Pentru scheme cinetice în cazul cărora este valabilă relația p(o) << 1 (caz destul de frecvent întâlnit în situații experimentale reale):

$$\sigma_I^2 \approx I\gamma(V-V_{Nerst}) \qquad (17.30)$$

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Conform teoriei lui Rayleigh:

$$\sigma_I^2 = \int_0^{\infty} S(f)df \tag{17.31}$$

Rezultă că utilizând valoarea ce reprezintă integrala funcției spectrului de puteri și măsurând curentul electric macroscopic mediu înregistrat în condițiile în care diferența de potențial transmembranar aplicată din exterior este V, se poate determina conductanța electrică a unui singur canal ionic. Acest parametru este de importanță deosebită în studierea proprietăților de permeație prin canale ionice, în încercarea de a descifra legătura indisolubilă dintre structură și funcțiile lor.

2. Dacă schema cinetică considerată mai sus este aplicabilă unui model simplificat de activare a canalelor ionice ligand-dependente, atunci putem asimila starea 'închis' a canalului ionic (C) cu situația în care el nu interacționează cu ligandul (L) și starea 'deschis' cu situația în care el este activat de ligand (LC) (cel mai simplu exemplu formal în acest sens îl constituie activarea receptorului de acetilcolină). În acest caz, putem scrie următoarea schemă de reacție:

$$\underset{\text{'închis'}}{L + C} \overset{\alpha}{\underset{\beta}{\Leftrightarrow}} \underset{\text{'deschis'}}{LC} \tag{17.32}$$

iar ratele de reacție α și β pot fi exprimate în funcție de constantele de reacție k_{on} (tranziția din starea 'închis' în 'deschis') și k_{off} astfel:

$$\begin{aligned} \alpha &= [L]k_{on} \\ \beta &= k_{off} \end{aligned} \tag{17.33}$$

Un alt parametru important derivat din analiza numerică a funcției spectrului de puteri de mai sus îl reprezintă f_c ('corner frequency') care, prin definiție, este frecvența la care este adevărată relația de mai jos:

$$S(f_c) = \frac{1}{2} S(f)_{f \to 0} \tag{17.34}$$

Din formulele de mai sus, se poate arăta că:

$$f_c = \frac{\alpha + \beta}{2\pi} = \frac{[L]k_{on} + k_{off}}{2\pi} \tag{17.35}$$

Prin realizarea de experimente repetate în care este măsurată f_c în funcție de concentrația ligandului L, se poate trasa în final un grafic ce reprezintă variația liniară a lui $f_c = f([L])$.

Prin extrapolarea acestui grafic la valori foarte mici ale lui [L] (din formula de mai sus, $[L] \to 0$), se poate determina grafic valoarea lui k_{off} a reacției moleculare analizate:

BCU CLUJ / CENTRALA UNIVERSITARĂ LIBRARY

$$k_{off} = 2\pi \lim_{[L]\to 0} f_c \qquad (17.36)$$

Aşadar, în cadrul acestui formalism simplu, reacţia moleculară între canalul ionic şi moleculele de ligand poate fi complet caracterizată şi din punct de vedere cinetic. Aceste rezultate sunt esenţiale pentru înţelegerea fenomenelor de 'gating' ale canalelor ionice.

Cu toate că informaţiile ce se pot afla despre funcţia canalelor ionice în urma analizei tip 'current-noise' sunt destul de consistente stiinţific, nu trebuie să uităm că formalismul prezentat mai sus este bazat pe câteva presupuneri foarte simplificatoare, care, din nefericire, nu sunt uşor de asimilat cu situaţii naturale:

a. Am considerat că populaţia de canele ionice studiată este omogenă din punct de vedere al speciilor de canale ionice existente în biomembrană. După cum este prezentat în tabelul de la începutul acestui capitol, se vede că datorită densităţii mari de canale ionice *distincte funcţional* din biomembrane, pe arii membranare de ordinul ~ μm^2 pot exista mai multe specii de canale ionice. În aces caz, fluctuaţile de curent electric analizate vor conţine contribuţii de la *toate* canalele ionice, *individuale şi diferite funcţional*, existente în porţiunea ('patch') de biomembrană studiată.

b. Am presupus că aceste canale ionice studiate sunt independente, adică proprietăţile cinetice, de 'gating', ale oricări canal individual sunt independente de proprietăţile canalelor ionice din imediata sa vecinătate. În termeni mai simpli, probabilitatea ca un canal ionic să fie în starea 'deschis' în timpul dt depinde doar de produsul (αdt) şi nu de starea moleculară în care se află oricare canal ionic din vecinătatea sa. Există însă multe situaţii experimentale în care s-a demonstrat prezenţa interacţiunilor între canale ionice distincte, în sensul că afirmaţia de mai sus devine falsă. Prezenţa acestor interacţiuni şi efectele induse în comportamentul cinetic molecular al canalelor ionice sunt denumite procese de cooperativitate. Într-o asemenea situaţie, funcţia de autocorelaţie a unei populaţii de canale ionice nu se va mai calcula aşa cum a fost arătat mai sus (produsul între numărul N de canale ionice şi funcţia de autocorelaţie a unui singur canal ionic), ci analiza fluctuaţiilor de curent va fi mult mai elaborată matematic.

c. În exemplele abordate mai sus, s-a presupus că, din punct de vedere molecular, canalul ionic poate face tranziţii între doar două conformaţii distincte din punct de vedere al măsurătorilor electrice (i.e., conductanţa nulă – 'închis' şi finită – 'deschis'). În natură însă lucrurile nu stau astfel; majoritatea covârşitoare a canalelor ionice au schema cinetică mult mai complicată, existând mai multe stări moleculare 'închis' şi 'deschis' ce formează 'gating'-ul lor. Dacă toate stă-

rile tip 'deschis' au aceeași conductanță, ipoteza care nu a putut fi verificată pentru o specie particulară de canal ionic, decât prin analize de tip 'patch-clamp'. spectrul de puteri al fluctuațiilor de curent macroscopic ale unei populații de N canale ionice ce realizează tranziții între k stări moleculare distincte (în cazul de mai sus, k = 2) va fi dat de formula generală:

$$\hat{S}(f) = const. \sum_{i=2}^{k} a_i \frac{\theta_i}{1+\omega^2\theta_i^2} \qquad (17.37)$$

În formula de mai sus, termenii "const." și "a_i" sunt constante pentru populația de proteină studiate iar, spre deosebire de situația simplificată de mai sus, θ_i sunt combinații liniare ale tuturor ratelor de tranziție din schema cinetică a canalului ionic. De aceea, în situații descrise mai sus, nu mai este posibilă evaluarea precisă a constantelor de reacție, cum am făcut în cazul schemei simplificate de mai sus. Pentru cazul real considerat, informațiile extrase în urma unei astfel de analize se referă la numărul total (n) de stări ('închis' și 'deschis') ce constituie 'gating'-ul unui canal ionic (n = k + 1, unde k este numărul de funcții tip Lorenz necesare pentru a fita experimental dependența $\hat{S}(f)$) și se poate aprecia global dacă un anumit factor exogen (temperatură, potențial, interacțiunea dintre canale ionice și liganzi specifici) produce modificări ale proceselor de 'gating' (evaluat prin modificări ale parametrilor θ_i în condiții experimentale specifice).

Cu toate aceste 'neajunsuri', tehnica de analiză a proprietăților canalelor ionice 'current-noise' a fost singura posibilitate de investigație a proprietăților microscopice ale canalelor ionice, până la inventarea tehnicii 'patch-clamp'. Această tehnică a jucat un rol foarte important în analiza calitativă a proceselor de 'gating', ajutând astfel la înțelegerea mai bună a proceselor moleculare care fundamentează existența departe de echilibru a celulelor vii și deci a vieții.

Mai trebuie precizat că pe lângă fluctuațiile de curent macroscopic datorate proceselor de 'gating' ale canalelor ionice, funcția $\hat{S}(f)$ conține și alți termeni, care descriu procese fizice distincte.

Cum arătam mai sus, în cazul cel mai general, spectrul de puteri al fluctuațiilor de curent macroscopice $\hat{S}(f)$ poate fi scris astfel:

$$\hat{S}(f) = cons\tan t + \frac{1}{f} + const. \sum_{i=2}^{k} a_i \frac{\theta_i}{1+\omega^2\theta_i^2} \qquad (17.38)$$

unde:

BCU IAȘI CLUJ-NAPOCA LIBRARY

- termenul 'constant' (white noise) este asociat cu difuzia microscopică a sarcinilor electrice printr-un canal ionic aflat în starea 'deschis' (numeric egal cu $2\nu q^2$, unde ν este rata medie de difuzie a sarcinilor electrice elementare q prin porul canalului ionic)

- termenul 1/f este asociat cu existența unor procese de neechilibru în biomembrană

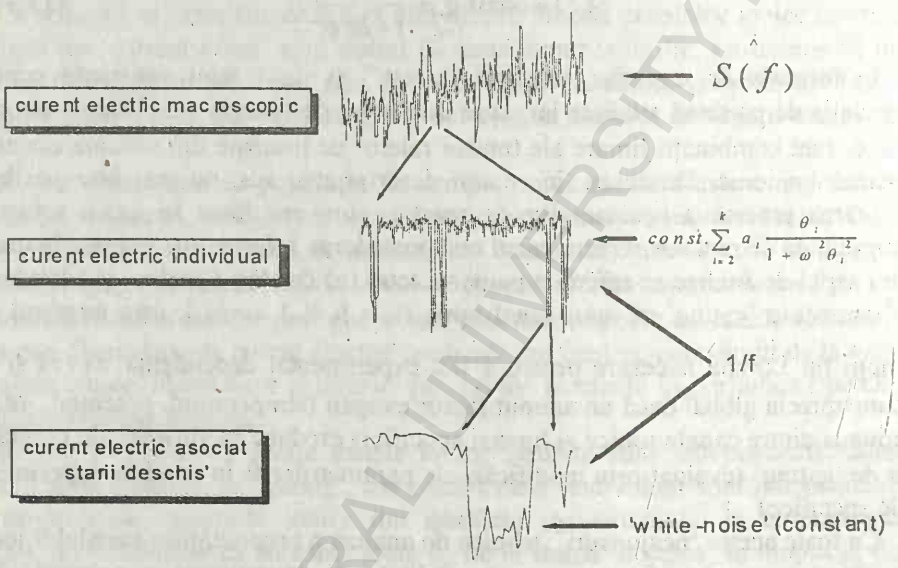


Fig. 105. Reprezentarea diferitelor componente de fluctuații de curent ce compun spectrul de puteri al componentei macroscopice $\hat{S}(f)$ a curentului ionic mediat de un canal ionic

De aceea, în procesul de analiză numerică a fluctuațiilor de curent macroscopic prin biomembrane, trebuie avută în vedere și contribuția acestor termeni la valoarea lui $\hat{S}(f)$. Pentru a extrage informații despre cinetica unor canale ionice cu ajutorul metodei fluctuațiilor de curent, trebuie ca din spectrul Fourier 'total' al semnalului de curent analizat să fie ales, așa cum justificam mai sus, doar acea componentă specifică ce este corelată univoc cu procesul de 'gating' al canalelor ionice studiate.

BCU "CAROL I" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

18. Comunicarea celulară

Celulele unui organism pluricelular trebuie să comunice între ele, pentru a asigura reglarea dezvoltării şi organizării ţesuturilor pe care ele le formează, pentru a controla rata de creştere şi diviziune celulară şi a coordona funcţiile lor individuale. Celulele animale comunică între ele prin trei moduri distincte:

1. ele secretă substanţe chimice specifice, care interacţionează cu alte celule distante;
2. posedă la nivelul biomembranei molecule special dezvoltate, care influenţează procesele celulare ale altei celule, cu care vine în contact nemijlocit;
3. formează căi de comunicaţie fizică cu o altă celulă ('gap junctions'), astfel încât între mediile citoplasmatice a două celule în contact se realizează un schimb nemijlocit de substanţă.

Cele mai importante etape ale procesului de comunicare intercelulară, denumit şi '**signal transduction cascade**', sunt următoarele:

1. Sinteza moleculei de semnalizare (hormon, pheromon, neurotransmiţător)
2. Exocitoza moleculelor de semnalizare (de către celula 'emiţător')
3. Transportul semnalului conţinut în exocitoza moleculelor de semnalizare la celula 'ţintă'
4. Detecţia semnalului (a moleculelor de semnalizare) de către proteine specializate (receptori), în celula 'ţintă'
5. Inducerea unor modificări în metabolismul celular al celulei ţintă (sau al mecanismului de expresie genetic) de către complexul molecular *molecula de semnalizare - receptor*
6. Eliminarea moleculelor de semnalizare din mediul intercelular, ce implică terminarea reacţiei celulare în celula 'ţintă'

18.1. *Strategii de comunicare celulară*

Mecanismele de comunicare celulară descrise anterior sunt constituite pe trei strategii generale:

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

1. **Comunicarea endocrină**, în care celule endocrine specializate secretă mediatori chimici specifici (hormoni) ce difuzează prin mediul sanguin interstiţial până la celulele ţintă ce sunt distribuite în tot volumul corpului;

2. **Comunicarea paracrină,** în care celulele implicate secretă mediatori chimici locali care interacţionează doar cu celulele din imediata vecinătate; acest fenomen se explică prin aceea că timpul de viaţă al acestor mediatori este scurt – ei sunt inactivaţi, imobilizaţi sau chiar recapturaţi de celula care i-a eliberat în spaţiul intercelular;

3. **comunicarea sinaptică**, ce este caracteristică sistemului nervos; în acest tip de comunicare, molecule specifice (neurotransmiţători) sunt eliberate în regiuni celulare specializate (sinapse) şi apoi difuzează în spaţiu sinaptic (~50 nm) pentru a interacţiona cu celula ţintă (postsinaptică)

Tabel 13. Cele mai importante molecule implicate în procesele de comunicare celulară endocrină, paracrină şi sinaptică

MOLECULA DE COMUNICARE	LOCUL DE ORIGINE	EFECTE MAJORE INDUSE
• **Hormoni**		
Insulină	Celulele β ale pancreasului	Resorbţia glucozei în celule, stimularea sintezei proteice
Somatotropină	Glanda pituitară	Stimularea ficatului în a produce somatomedin-1, cu rol în creşterea muşchilor şi a oaselor
Vasopresină	Glanda pituitară	Măreşte presiunea sanguină prin constricţia vaselor sanguine
Cortisolul	Cortexul adrenal	Efecte în metabolismul proteinelor, carbohidraţilor şi lipidelor
Estradiol	Ovar, placentă	Dezvoltarea şi menţinerea caracteristicilor sexuale feminine
Testosteron	Testicule	Dezvoltarea şi menţinerea caracteristicilor sexuale masculine
• **Mediatori chimici locali**		
Prostaglandina E_2	Majoritatea celulelor	Contracţia muschiului neted
Factorul de creştere nervoasă	Piele, ţesuturi inervate de nervii simpatici	Supravieţuirea şi creşterea neuronilor senzoriali şi simpatici
• **Neurotransmiţători**		
Glicină	Terminaţii nervoase	Inhibă transmisia informaţiei nervoase în SNC
GABA	Terminaţii nervoase	Inhibă transmisia informaţiei nervoase în SNC
Acetilcolină	Terminaţii nervoase	Funcţie de excitaţia nervoasă la joncţiunea neuromusculara, efecte inhibitorii şi excitatorii în SNC

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

În tabelul 13 am prezentat exemple selectate de molecule implicate în cele trei tipuri de comunicare celulară enumerate mai sus.

Trebuie menționat că un singur tip de moleculă de semnalizare a informației de comunicare între celule poate induce efecte diferite în celule diferite.

De exemplu, acetilcolina stimulează contracția musculară în celulele mușchiului scheletic, însă descreşte rata de contracție şi forța de contracție în mușchiul cardiac. După cum vom dezvolta mai jos, aceasta se explică prin aceea că moleculele proteice receptoare din cele două țesuturi sunt diferite structural şi funcțional.

18.2. *Clasificarea moleculelor utilizate în comunicarea celulară din punct de vedere al solubilității în apă*

Cei mai mulți hormoni şi mediatori chimici locali, precum şi toți neurotransmițătorii sunt molecule solubile în apă. În acest fel, pentru a transmite informație în procesul de comunicare celulară, aceste molecule solubile în apă nu pot penetra biomembranele (pentru justificare fizică, vezi capitolele precedente); ele interacționează doar cu proteine membranare integrale specifice, numite receptori membranari (Fig. 106).

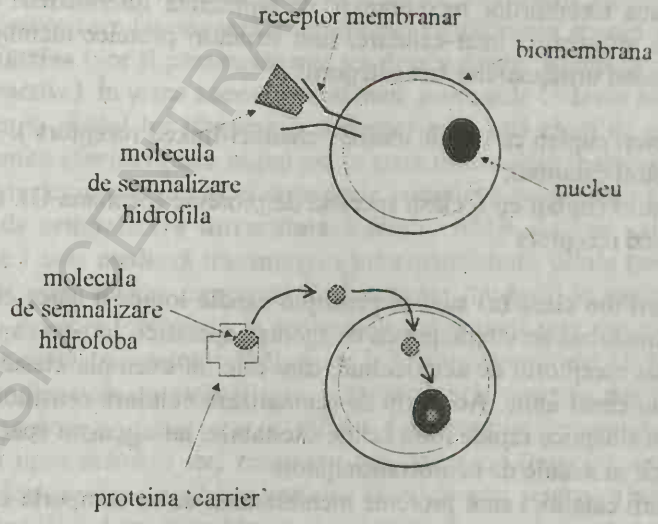


Fig. 106. Diferența de principiu între mecanismele ce mediază comunicarea celulară, în cazurile în care moleculele de semnalizare sunt hidrofile sau hidrofobe

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Hormonii steroizi şi cei tiroidieni însă, sunt molecule hidrofobe şi deci pot traversa cu uşurinţă mediul liposolubil biomembranar; aceste molecule interacţionează în procesul de comunicare celulară cu receptori localizaţi în citosol sau chiar în nucleul celular (Fig. 106). Tot datorită caracterului lor de hidrofobicitate, aceste molecule de semnalizare celulară difuzează prin mediul apos (sanguin) de la celula emiţătoare la cea ţintă prin intermediul unor proteine special structurate, denumite proteine 'carrier'. Hormonii steroizi sunt derivaţi ai colesterolului şi, odată ce interacţionează cu receptori specifi citosolici, provoacă tranziţia acestora într-o stare moleculară activată în care ei au afinitate maximă pentru ADN; complexul astfel format contribuie la reglarea transcripţiei anumitor gene, închizând lanţul de transmitere al informaţiei.

Spre deosebire de receptorii citosolici, receptorii transmembranari nu contribuie la reglarea directă a expresiei genetice, în cursul comunicării intercelulare. Modul în care ei transmit informaţia la celula ţintă se realizează prin activarea unor proteine membranare suplimentare, care influenţează direct procesele biocinetice moleculare din citosol sau nucleul celular.

18.3. *Clasificarea receptorilor transmembranari implicaţi în procesele de comunicare intercelulară*

Majoritatea receptorilor membranari, ce reprezintă intermediari esenţiali în transmiterea informaţiei inter-celulare, sunt structuri proteice membranare integrale aparţinând următoarelor trei categorii:

a. receptori cuplaţi cu canale ionice ('channel-linked receptors');
b. receptori catalitici;
c. receptori cuplaţi cu o clasă specială de proteine (proteina G), denumiţi 'G protein-linked receptors'.

Receptorii din clasa (a) sunt în principiu canale ionice a căror cinetică ('gating') este modulată de interacţiunea cu agonişti specifici. Într-un capitol anterior am prezentat receptorul de acetilcolină, care este un exemplu clasic de receptor cuplat cu un canal ionic. Acest tip de semnalizare celulară constituie substratul comunicării sinaptice rapide între celule excitabile, iar agoniştii specifici nu sunt altceva decât molecule de neurotransmiţători.

Receptorii catalitici sunt proteine membranare, ce se comportă ca nişte enzime clasice în urma interacţiunii lor cu anumiţi liganzi. În urma activării lor, aceste 'enzime' catalizează reacţii de fosforilare intracelulară, în care gruparea

fosforilată este mai ales tirozina. Pentru descrierea reacțiilor de fosforilare, vezi noțiunile introduse în capitolele anterioare.

Receptorii cuplați cu proteina G activează sau inactivează indirect proteine integrale membranare (enzime sau canale ionice), în urma interacțiunii specifice receptor – agonist. Este bine stabilit că aproape 80 % din totalul moleculelor de semnalizare (hormoni, neurotransmițători, neuromodulatori) mediază transmiterea informației intercelulare prin intermediul receptorilor cuplați cu proteine G (proteine ce leagă complexul de guanil-nucleotide – GTP, GDP, GMP), iar schema de reacții moleculare celulare implicate în acest proces este ilustrată mai jos:

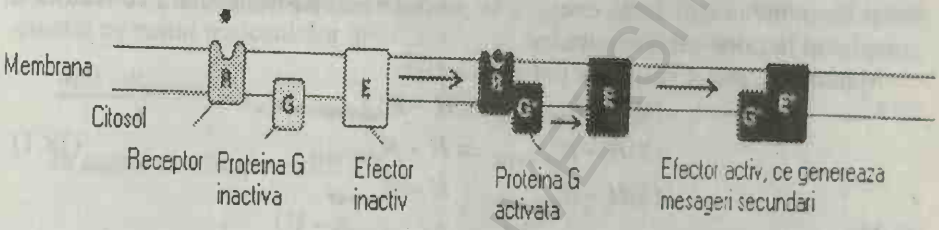


Fig. 107. Schema de reacții moleculare celulare implicate în comunicarea celulară mediată de proteina G [*Luchian, T. 1997, Ph. D. Thesis, Graz*] (vezi text)

Așadar, în urma interacțiunii între moleculele de semnalizare și receptorii specifici membranari (`receptor proteins`), au loc modificări alosterice în structura receptorilor care favorizează interacțiunea cu afinitatea sporită a lor cu **proteine G inactive** (vor fi prezentate mai jos detalii despre structura proteinelor G active și inactive). În urma acestei interacțiuni, proteinele G devin **activate** și pot interacționa la rândul lor (favorabil energetic) cu o altă clasă de proteine integrale denumite **efectori** (care inițial era în stare moleculară **inactivată**). În acest fel, efectorii devin *activați* și ei sunt acele complexe moleculare ce generează **molecule de semnalizare intracelulară** (ciclic AMP, ioni de calciu, inositol trifosfat etc.) care mediază transmiterea informației între celule (moleculele de semnalizare intracelulară reprezintă deci varianta `tradusă` în limbaj celular al informației primare, conținută în moleculele de semnalizare din mediul extracelular – hormoni, neurotransmițători etc.). Trebuie menționat că după interacțiunea cu moleculele de semnalizare, toate procesele cinetice descrise mai sus sunt limitate doar de fenomene de difuzie a proteinelor în planul membranei. Chiar și în lipsa activării lor, receptorii pot coliziona (mișcare browniană) cu molecule efectoare inactivate sau proteine G inactivate: pentru ca aceste procese moleculare să devină reacții moleculare exoenergetice, trebuie ca moleculele implicate (receptori, proteine G, efectori) să adopte conformații terțiare și cuaterna-

re bine stabilite (stări activate), care să facă interacţiunile ulterioare favorabile energetic.

În ceea ce priveşte procesele de difuzie descrise mai sus, trebuie menţionat un aspect fizic important privitor la acei parametri care controlează viteza de reacţie a proceselor de interacţiune implicate.

Ca exemplu, să considerăm prima parte a reacţiei din lanţul de transmitere al informaţiei în schema de mai sus; pentru a interacţiona cu receptorul specific, molecula de semnalizare (e.g., hormon) trebuie să difuzeze până în imediata ei vecinătate. Apoi, odată realizat contactul fizic, când cele două molecule (receptor şi hormon) au suficientă energie, se produce reacţia moleculară ce rezultă în complexul hormon-receptor activat.

Matematic, aceste reacţii se pot scrie astfel:

$$\begin{aligned} &(1) H + R_{inactivat} \Rightarrow H - R_{inactivat} \\ &(2) H - R_{inactivat} \Rightarrow H + R_{inactivat} \\ &(3) H - R_{inactivat} \Rightarrow H - R_{activat} \end{aligned} \tag{18.1}$$

unde:

- H este molecula de semnalizare (hormon)

După cum reiese din explicaţiile de mai sus, viteza de formare a produsului receptor inactivat – hormon ($H\text{-}R_{inactivat}$ - prima reacţie) este:

$$v = k_d[H][R_{inactivat}] \tag{18.2}$$

unde k_d este constanta de reacţie determinată de difuzia hormonilor spre receptori.

După ce s-a realizat contactul fizic între cele două molecule, următoarele fenomene biofizice pot avea loc:

- ele fie se pot disocia, fără să interacţioneze molecular, şi deci să conducă la schimbări de conformaţie în structura receptorului inactivat, (reacţia a 2-a de mai sus) cu viteza de reacţie:

$$v = k_d'[H - R_{inactivat}] \tag{18.3}$$

- fie pot interacţiona la nivel molecular, conducând la generarea unei molecule de receptor activată (reacţia a 3-a), cu viteza de reacţie:

$$v = k_a[H - R_{inactivat}] \tag{18.4}$$

Utilizând formalismul complexului activat, în relaţia de mai sus:

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

$$k_a = \frac{kT}{h} e^{-\frac{G_{H-R_{activat}} - G_{H-R_{inactivat}}}{RT}} \quad (18.5)$$

unde:

- $G_{H\text{-}Ractivat}$, $G_{H\text{-}Rinactivat}$ sunt valorile energiilor libere molare pentru cele două complexe moleculare
- h este constanta lui Planck

Considerând că produsul molecular $H\text{-}R_{inactivat}$ se află în relativ echilibru cinetic cu restul moleculelor din reacțiile de mai sus, putem scrie:

$$\frac{d[H-R_{inactivat}]}{dt} = k_d[R_{inactivat}][H] - k_d'[H-R_{inactivat}] - k_a[H-R_{inactivat}] \approx 0 \quad (18.6)$$

În aceste condiții, rezultă:

$$[H-R_{inactivat}] \approx \frac{k_d[R_{inactivat}][H]}{k_a + k_d'} \quad (18.7)$$

Viteza de formare a produsului de reacție studiat (compusul hormon – receptor activat) este dată de:

$$\frac{d[H-R_{activat}]}{dt} \approx k_a[H-R_{inactivat}] = k_2[R_{inactivat}][H]$$
$$k_2 = \frac{k_a k_d}{k_a + k_d'} \quad (18.8)$$

Analizând această ultimă relație, se pot distinge două cazuri particulare ale setului de reacții de mai sus:

1. dacă rata de separare a compusului $H\text{-}R_{inactivat}$ este mult mai mică decât rata cu care se formează produsul de reacție $H\text{-}R_{activat}$ ($k_d' << k_a$), atunci rata efectivă de formare a produsului de reacție este $k_2 \sim k_d$: în acest caz spunem că rata reacției de formare a produsului molecular hormon – receptor activat este controlată de procesele de difuzie din soluția externă
2. dacă $k_a << k_d'$, spunem că reacția de formare a produsului molecular hormon – receptor activat este controlată de bariera de activare a compusului $H\text{-}R_{inactivat}$

Pentru primul caz, ar fi interesant de stabilit valoarea cantitativă a ratei efective (k_d) cu care se formează compusul $H\text{-}R_{activat}$.

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Pentru aceasta, vom analiza procesele de difuzie ale moleculelor H spre cele de $R_{inactivat}$.

Ecuația ce descrie variația concentrației moleculelor de hormon (H) în jurul unei molecule de receptor inactivat ($R_{inactivat}$), în cazul unei simetrii sferice, este dată de formula binecunoscută:

$$\frac{d^2[H]_r}{dr^2} + \frac{2}{r}\frac{d[H]_r}{dr} = 0 \qquad (18.9)$$

Soluția generală a acestei ecuații este:

$$[H]_r = a + \frac{b}{r} \qquad (18.10)$$

Utilizând condițiile la limită:

$[H]_r = [H]_{solutie}$, pentru $r \to \infty$

şi

$[H]_r = 0$, pentru $r = R^*$ (distanța la care trebuie să se apropie două molecule, pentru a forma complexul molecular $H\text{-}R_{inactivat}$)

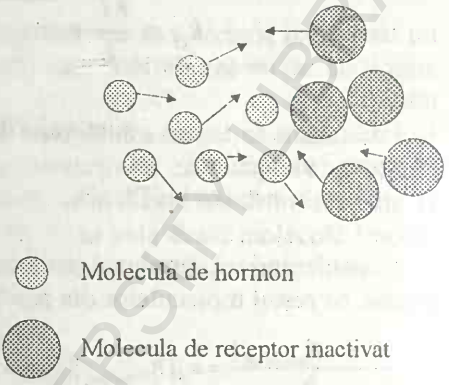


Fig. 108. Secvența unidimensională posibilă din procesul de interacțiune stochastic între moleculele de hormon şi cele de receptor inactivat

soluția particulară a ecuației de mai sus devine:

$$[H]_r = \left(1 - \frac{R^*}{r}\right)[H]_{solutie} \qquad (18.11)$$

Rata cu care moleculele de hormon interacționează cu cele de receptor este dată de fluxul molar al moleculelor de hormon spre cele de receptor la distanța $r = R^*$ înmulțit cu aria unei suprafețe sferice de raza R^*:

$$rata_{H \to R_{inactivat}} = D_H 4\pi R^* [H]_{solutie} \qquad (18.12)$$

În deducerea relației de mai sus, s-a considerat că moleculele de hormon interacționează doar cu o singură molecula de receptor, aflată în repaus: dacă se consideră că numărul de molecule R într-un volum V este $N_A[R]V$ (N_A este numărul lui Avogadro) şi că aceste molecule nu se află în repaus (în formula de mai sus, introducem în locul constantei de difuzie D_H valoarea $D = D_H + D_R$; D_R este valoarea constantei de difuzie pentru moleculele de receptor în membană), valoarea ratei de reacție pentru exemplul studiat este dată de:

$$\frac{d[H - R_{inactivat}]}{dt} = 4\pi R^* D N_A [H][R_{inactivat}] \qquad (18.13)$$

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

În acest fel, deducem imediat valoarea parametrului k_d în cadrul formalismului cinetic studiat:

$$k_d = 4\pi R^* D N_A \qquad (18.14)$$

Această formulă dă informații cantitative despre parametrii moleculari care controlează rata de formare a complexelor moleculare $H\text{-}R_{inactivat}$ și care este egală cu rata de formare a complexelor moleculare $H\text{-}R_{activat}$, când ratele reacțiilor sunt controlate de difuzie – vezi mai sus.

În cazul studierii modelelor cinetice de acest fel, este foarte important de făcut distincție între cele două procese moleculare diferite, guvernate de parametri fizici diferiți (vezi expresiile lui k_d și k_a), care conduc la formarea unui produs molecular de reacție de interes pentru analiza biofizică ulterioară ($H\text{-}R_{activat}$):

- procese de difuzie clasică ce se desfășoară în soluție și membrana celulară;
- procese de interacție moleculară, în cursul cărora se generează produsul de studiat.

Într-o exprimare simplificată, dacă se urmărește într-un experiment variația temporală a concentrației unor molecule activate de interacțiunea cu agoniști specifici (e.g., activarea unor canale ionice agonist-dependente din membrana celulară ca urmare a adiției agoniștilor în soluția extracelulară), este esențial de știut că rata reală de activare observată experimental reprezintă o combinație liniară între ratele de difuzie ale moleculelor implicate și cea de interacție moleculară între ele.

În continuare, vor fi prezentate detalii structurale despre moleculele implicate în lanțul de comunicare celulară descris mai sus.

18 3.1. *Receptori cuplați cu proteina G*

Deși există o varietate foarte largă de receptori specifici care se cuplează cu proteina G în urma interacțiunii lor cu molecule de semnalizare din mediul extracelular, ei formează o clasă specială de proteine cu un mare grad difersitate funcțională, având următoarele proprietăți generale:

1. Secvența lor terțiară este alcătuită din șapte domenii tip α-helix, cu lungimi de 22-24 aminoacizi, despre care se presupune că traversează biomembrana integral.

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

2. Domeniul peptidic de legătură dintre domeniile tip α-helix 5 şi 6, împreună cu partea citoplasmatică, terminală, de la extremitatea carboxil a proteinei este de importanţă majoră pentru interacţiunea cu proteinele G.

3. O dată activaţi, receptorii interacţionează energetic favorabil cu proteinele G inactive, care sunt proteine integrale, şi le activează; în această etapă, receptorul activat serveşte drept catalizator pentru reacţia de schimbare a GDP cu GTP din structura proteinei G (vezi mai jos), iar produsul de reacţie final este proteina G activată.

Terminarea fenomenelor de comunicare celulară în acest context are loc prin două metode:

a. proteina G activată serveşte drept catalizator pentru hidroliza GTP ($GTP \Leftrightarrow GDP + H_2O$) din componenta sa, devenind astfel inactivată

b. după interacţiunea cu molecule de semnalizare specifice (adică după activarea lor), aceşti receptori pot intra într-o stare moleculară inactivă, în care interacţiunea cu proteina G devine nefavorabilă energetic, fenomen datorat fosforilării lor (mai specific, a reziduurilor de serină şi threonina de la capatul COO^-)

18.3.1.1. *Proteina G*

În stare inactivă, proteinele G au conformaţie cuaternară de heterotrimeri, fiind formate din trei subunităţi (denumite α, β şi γ) intercuplate cu o stoichiometrie de 1:1:1. În ciuda faptului că subunităţile β şi γ nu interacţionează covalent, disocierea lor conduce la denaturarea proteinei G; aşadar, aceste două subunităţi formează o singură subunitate funcţională. Subunităţile G_α şi $G_{\beta\gamma}$ sunt proteine integrale; monomerii G_α interacţionează cu miezul hidrofob al biomembranei prin intermediul unor grupări tip myristoyl sau palmitoyl, iar dimerul $G_{\beta\gamma}$ prin intermediul grupărilor farnesyl sau geranyl. Experimente de izolare şi identificare proteică au dovedit existenţa unei largi heterogenităţi structurale a subunităţilor funcţionale ale proteinelor G: există cel puţin 20 tipuri de subunităţi G_α, 5 G_β si 12 G_γ. Intercuplarea cu grad mare de diversificare a acestor subunităţi dă naştere unor posibilităţi extrem de variate în ceea ce priveşte modularea semnalelor de comunicare celulară.

În starea sa inactivă, proteina G există deci ca un trimer în care pe subunitatea G_α este legată o moleculă de guanozin di-fosfat (GDP); în urma interacţiunii cu un receptor activat, datorită modificărilor alosterice în structura subunităţii G_α,

BUCHAREST CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

afinitatea acestei grupări pentru GDP scade dramatic şi creşte pentru GTP. Interacţiunea dintre GTP şi subunitatea G_α conduce la disocierea proteinei G în cele două subunităţi funcţionale. În continuare, subunitatea G_α interacţionează favorabil cu moleculele efectoare şi le activează, asigurând continuitatea transmiterii informaţiei între celule.

Trebuie menţionat că există sisteme celulare specifice – canalele de potasiu tip 'inward-rectifier' modulate de proteina G – în care subunitatea $G_{\beta\gamma}$ a proteinei G activate reprezintă veriga esenţială în acest lanţ de comunicaţie.

În tabelul următor sunt prezentate câteva exemple de subclase ale monomerilor G_α, împreună cu efectele induse, proteinele efectoare asociate şi mesagerii secundari produşi de efectorii activaţi.

Tabel 14. Exemple de subclase ale monomerilor G_α, împreună cu efectele induse, proteinele efectoare asociate şi mesagerii secundari produşi de efectorii activaţi

SUBCLASA G_α	EFECT	PROTEINA EFECTOARE ASOCIATĂ	MESAGER SECUNDAR (EFECT) PRODUS
G_s	↑	Adenylate cyclasa	cAMP
	↑	Canal de Ca^{2+}	Ca^{2+}
	↓	Canal de Na^+	Modificare în potenţialul transmembranar
G_i	↓	Adenylate cyclasa	cAMP
	↑	Canal de K^+	Modificare în potenţialul transmembranar
	↓	Canal de Ca^{2+}	Ca^{2+}
G_q	↑	Phospholipasa C	IP_3, DAG
G_o	↑	Phospholipasa C	IP_3, DAG
	↓	Canal de Ca^{2+}	Ca^{2+}
G_t	↑	cGMP phosphodiesterasa	cGMP

18.3.1.2. *COMPLEXE MOLECULARE EFECTOARE*

După cum este exemplificat şi în tabelul de mai sus, în funcţie de sistemul celular ţintă, există mai multe clase de molecule efectoare (adenylate cyclasa, phospholipasa C, canale ionice, cGMP phosphodiesterasa).

În cele ce urmează, discuţia va fi particularizată pe două tipuri de molecule efectoare din cele menţionate, cu rol major în cea mai mare parte a procesului de comunicare celulară în organismele uni- şi pluricelulare.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Adenylate cyclasa

Schema generală de reacţie, în cazul în care comunicarea celulară se efectuează via această proteină efectoare, este schiţată mai jos:

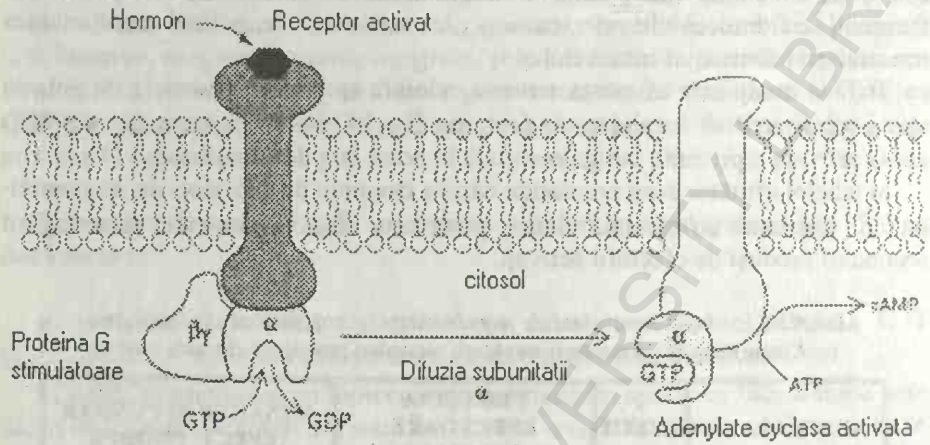


Fig. 109. Reprezentarea moleculară simplificată a unei secvenţe de comunicare celulară mediată de adenylate cyclasa, prin intermediul unei proteine G stimulatoare [*Luchian, T. 1997, Ph. D. Thesis, Graz*]

În urma interacţiunii între un receptor specific activat ('activated receptor') şi o proteină G, aceasta din urmă se activează (subunitatea G_α a eliberat molecula de GDP şi interacţionează cu GTP) şi interacţionează cu o proteină membranară integrală, adenylate cyclasa. La rândul ei, această proteină se activează, prin intermediul modificărilor alosterice induse de interacţiunea cu G_α-GTP, şi catalizează formarea unui mesager secundar esenţial în procesul de comunicare celulară, cAMP.

Acest set de reacţii poate fi scris astfel:

$$
\begin{aligned}
&R_{inactiv} + hormon \Leftrightarrow R_{activat} \\
&R_{activat} + (G_\alpha^{GDP} - G_{\beta\gamma})_{inactiv} + GTP \Leftrightarrow R_{activat} + (G_\alpha^{GTP})_{activat} + G_{\beta\gamma} + GDP \\
&(G_\alpha^{GTP})_{activat} + AC_{inactiv} \Rightarrow (G_\alpha^{GTP} - AC)_{activat} \\
&(G_\alpha^{GTP} - AC)_{activat} + ATP \Rightarrow (G_\alpha^{GTP} - AC)_{activat} + cAMP + 2PO_4^{3-}
\end{aligned}
\qquad (18.15)
$$

Rezultatul principal al acestor reacţii, din punct de vedere al procesului de comunicare celulară, cAMP, îşi exercită funcţia de mesager secundar prin activarea unei enzime, denumită $cAMP_{dependent}$ - protein-kinasa. Această enzimă catalizează transferul unei grupări fosfat de la ATP pe reziduuri specifice (serina şi threonina) de pe celula ţintă, inducând efecte fiziologice caracteristice.

BCU CLUJ - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabelul următor sumarizează câteva din efectele fiziologice mediate de cAMP în procesul de comunicare celulară.

Tabel 15. Exemple de efecte fiziologice mediate de cAMP în procesul de comunicare celulară

ŢESUTUL ŢINTĂ	MOLECULA DE SEMNALIZARE	RĂSPUNS FIZIOLOGIC
Ovar	Hormonul de luteinizare	Secreţie de progesteron
Muşchi, ficat	Epinefrină	Scindarea glicogenului
Inimă	Epinefrină	Creşterea ritmului cardiac şi a forţei de contracţie
Rinichi	Vasopresină	Resorbţia apei
Grăsimi	Epinefrină, glucagon	Scindarea trigliceridelor

Phospholipasa C

În acest lanţ de comunicare celulară, receptorul membranar activat de agonişti extracelulari activează o proteină G specifică, care interacţionează apoi favorabil cu phospholipasa C. Odată activată, aceasta catalizează o reacţie de scindare a *phosphatidyl-inositol-bisphospate* (abreviat PIP$_2$ - fosfolipida membranară) în *inositol triphosphate* şi *diacylglycerol*. Din acest punct, în schema de reacţie comunicarea celulară continuă pe două căi distincte:

1. *inositol triphosphate*-ul, care este molecula solubilă în apă, interacţionează cu alţi receptori specifici din membrana unor organe citosolice, contribuie la deschiderea unor canale de calciu din aceste membrane şi măreşte astfel concentraţia de calciu din citosol. În acest caz, se poate aprecia că ionii de calciu au rol de mesageri secundari. Ionii de calciu din citosol interacţionează cu un receptor citosolic specific – calmodulina – iar aceasta, activată alosteric interacţionează cu aceşti ioni, modulează activitatea altor enzime celulare, denumite protein-kinase Ca^{2+}/calmodulin – dependente.

2. *diacylglycerol* – ul (moleculă liposolubilă), fie este degradat şi formează *acidul arahidonic*, cu rol esenţial în sinteza prostaglandinelor, fie activează o altă enzimă (*protein kinasa C*). Această enzimă catalizează fosforilarea unor aminoacizi specifici (serina sau threonina) în proteine-ţintă, inducând astfel modificări în răspunsul fiziologic al celulei ţintă. De exemplu, în multe celule animale, *protein kinasa C* fosforilează şi deci activează o proteină membranară schimbătoare de ioni (Na^+ - H^+), contribuind la creşterea pH-ului mediului citosolic; aceasta influenţează în răspuns proliferarea celulară.

Trebuie menţionat că cea mai mare concentraţie de protein kinasa C se găseşte localizată în creier, unde, printre alte funcţii ale sale, contribuie la fos-

BCU CLUJ UNIVERSITY LIBRARY

forilarea canalelor ionice în celulele nervoase, ceea ce duce la modularea proprietăților acestor canale ionice şi a excitabilității nervoase.

Cele mai importante caracteristici ale proceselor de comunicare celulară mediate de proteina G sunt *direcționalitatea şi amplificarea.*

Direcționalitatea poate fi înțeleasă astfel: deoarece GTP care activează proteina G este hidrolizat în GDP şi un rest fosforic, reacție catalizată chiar de proteina G activată – vezi mai sus, începerea unui nou ciclu în inducerea unui efect celular ca urmare a prezenței moleculelor de semnalizare implică reactivarea proteinei G; aceasta nu se poate întâmpla decât dacă proteina inactivată interacționează iarăşi cu un receptor activat. Cu alte cuvinte, etapa moleculară de transmitere a informației spre celula țintă începe cu un receptor activat.

Tabel 16. Prezentare comprehensivă a celor mai importante canale de comunicare intercelulară din țesuturile celulare animale

STIMUL	RECEPTOR	PROTEINA G IMPLICATĂ	EFECTOR	RĂSPUNS FIZIOLOGIC
Epinephrina	Receptorul β-adrenergic	G_s	Adenylate cyclasa	Scindarea glicogenului
Serotonina	Receptorul de serotonina	G_s	Adenylate cyclasa	Sensibilitate comportamentală
Lumina	Rhodopsina	Transducin	cGMP phosphodiesterasa	Excitare vizuală
Odoranți	Receptori olfactivi	G_{olf}	Adenylate cyclasa	Olfacție
Peptida fMet	Receptori chemotactici	G_q	Phospholipasa C	Chemotaxie
Acetilcolina	Receptori muscarinic	G_i	Canal ionic de potasiu	Diminuarea ritmului cardiac

În tabelul 16 am prezentat succint câteva dintre căile de comunicare esențiale din celulele animale.

Proprietatea de *amplificare* se referă la producerea foarte eficientă a mesagerilor secundari, în urma interacțiunii între o singură moleculă de receptor cu agonistul specific. Astfel, în cazul receptorilor β-adrenergici (mușchiul cardiac), un singur complex hormon (epinefrina, isoproterenol) - receptor activat conduce, prin fenomene de difuzie în planul biomembranei, la activarea a cel puțin 100 proteine G, până când receptorul devine inactivat. În continuare, fiecare proteină G activată interacționează cu o moleculă de adenylate cyclase, ceea ce conduce la sinteza unui număr apreciabil de molecule cAMP; acest proces încetează când GTP-ul este hidrolizat în GDP, molecula G devine inactivă şi se disociază de

adenylate cyclase – vezi mai sus. Aşadar, doar prin intermediul a două etape de amplificare, interacţiunea între o moleculă de hormon şi un receptor conduce la sinteza a mai multor sute de molecule de cAMP, realizându-se astfel amplificarea semnalului iniţial.

18.4. *Modul de acţiune al opiaţilor la nivel celular*

Datorită implicaţiilor sociale şi ştiinţifice importante, este interesant de studiat mecanismul celular al adicţiei organismului faţă de anumiţi agonişti.

Cel mai clasic exemplu în acest sens îl constituie fenomenul de "obişnuire" a organismului cu morfina, care este utilizata în tratarea durerii cronice.

În cel mai simplu mod de reprezentare, lanţul celular de comunicare între doi neuroni ce utilizează ca molecule de semnalizare neurotransmiţători (acetilcolina, GABA, etc.) poate fi schiţat ca mai jos:

În urma unei depolarizări a neuronului presinaptic, potenţialul de acţiune propagabil conduce la activarea canalelor de calciu pre-sinaptice de tip N; ionii de calciu sunt aceia care provoacă ulterior exocitoza neurotransmiţătorilor în spaţiu sinaptic, figurat mai sus prin săgeţi, asigurând continuitatea comunicării celulare.

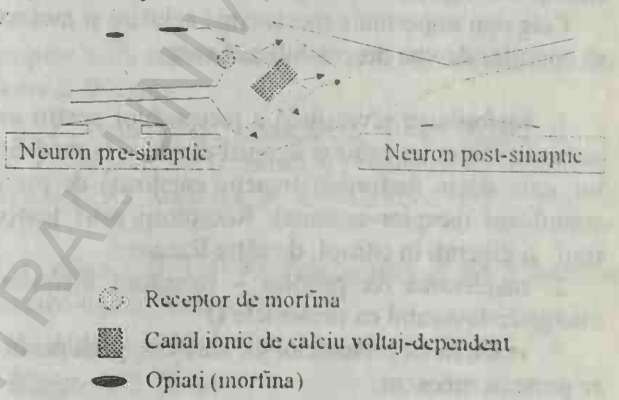


Fig. 110. Reprezentare morfologică simplificată a lanţului celular de comunicare între doi neuroni (pre-sinaptic şi post-sinaptic) ce utilizează ca molecule de semnalizare neurotransmiţători (acetilcolina, GABA, etc.)

În termeni calitativi clasici, cu cât există mai mult calciu intracelular (pentru cazul acestor sinapse – aflate mai ales în ganglionii dorsali ai SNC), cu atât se va elibera o cantitate mai mare de neurotransmiţători, şi deci va exista o persistenţă a potenţialelor de acţiune post-sinaptice, adică senzaţia de "durere" va fi activă.

În prezenţa opiaţilor (e.g., morfina) în spaţiul extracelular al celor doi neuroni, interacţiunea dintre aceştia şi receptorii specifici conduce la activarea unei proteine G, care la rândul ei activează efectori ce sintetizează mesageri secundari ce inhibă activitatea canalelor ionice de calciu voltaj-dependente presinaptice. În

acest fel, cantitatea de calciu redusă din citosolul neuronului pre-sinaptic, ce se acumulează în prezența potențialelor de acțiune pre-sinaptice, conduce la o eliberare mai mică de neurotransmițători. Aceasta provoacă o inhibiție a potențialelor de acțiune post-sinaptice şi deci o reducere a senzației de durere. În secvența de reacții descrise mai sus, sunt implicați: proteina G_o, phospholipasa C, diacylglycerolul şi protein-kinasa C (aceasta din urmă catalizează fosforilarea canalelor de calciu, ce conduce la *inhibarea* activității lor).

Aşadar, morfina ar constitui un mod foarte eficient de tratare a durerii cronice; în realitate, se observă un fenomen straniu: cu cât celulele sunt expuse mai mult timp opiaților, cu atât abilitatea lor (a celulelor) de a răspunde eficient la aceeaşi cantitate de agonist scade dramatic. Acest fenomen se numeşte **adaptare** sau **desensibilizare**.

Astfel, în cazul în care se doreşte tratarea durerii cronice în acest fel, cantități tot mai mari de morfină vor fi necesare, pentru obținerea unor rezultate identice ca în prima reacție.

Cele mai importante mecanisme celulare şi moleculare prin care celula expusă opiaților devine desensibilizată sunt:

1. fosforilarea reversibilă a receptorilor pentru morfină – în acest caz, interacțiunea dintre receptor şi agonist conduce la modificări de structură a receptorilor, care devin fosforilați (reacție catalizată de protein-kinaze activate doar de complexul receptor–agonist). Receptorii asfel fosforilați sunt ulterior 'sechestrați' şi digerați în citosol, de către lizozomi.
2. inactivarea receptorilor – receptorii fosforilați nu mai pot interacționa energetic-favorabil cu proteinele G
3. inactivarea proteinelor G, care este până acum un proces molecular în mare parte necunoscut.

De aceea, metodele moderne de tratare a durerii cronice implică etapa de concepere a unor molecule peptidice artificiale care interacționează foarte specific, doar cu acele canale de calciu de tip N din lanțul de transmitere al informației inter-celulare; această interacțiune nu afectează molecular receptorii sau proteinele G pre-sinaptice şi conduce la inactivarea canalelor ionice de calciu de tip N şi deci la inhibiția transmiterii informației nervoase.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Bibliografie

1. Biochemistry (4th edition). 1995. Stryer. L., W. H. Freeman and Company. New York
2. Biochemistry (2nd edition). 1983. Armstrong. B. F., Oxford University Press
3. Luchian, T. 1997. 'Gating modulation of a G-protein-activated inwardly-rectifying potassium channel by a cytosolic applied peptide', Ph.D. Thesis. 'Karl-Franzens' University of Graz (Austria)
4. Ionic Channels of Excitable Membranes. 1992. Hille. B., Sinauer Associates, Inc.
5. Voltage and patch clamping with microelectrodes. 1985. Eds. Smith. T., Jr. et al. Baltimore. Williams & Wilkins
6. Lewis. R. J., Nielsen. K. J., Craik. D. J., Lounghnan. M. L., Adams D. A., Sharpe, I. A., Luchian. T., Adams. D. J., Bond. T., Thomas L., Jones. A., Matheson. J.-A., Drinkwater. R., Andrews. P. R., Alewood. P.F. 2000. J. Biol. Chem. 275:45: 35335 - 35344
7. Luchian. T., Lewis. R. J., Adams. D. J. 1999. Proceedings of the Australian Physiological and Pharmacological Society 30(2): 95
8. Zagotta, W. N. and R. W. Aldrich 1990. J. Gen. Physiol. 95: 29-60
9. Catterall, A. W. 1988. Science 242: 50-61
10. Molecular Cell Biology (3rd edition). 1995. Lodish. H., Baltimore. D., Berk. A., Zipursky. S. L., Matsudaira. P., Darnell. J. W. H. Freeman and Company. New York
11. Armstrong C. M. and B. Hille 1998. Neuron 20: 371-380
12. Yellen, G. 1999. Curr. Opin. Neurobiol. 9: 267-273
13. Unwin, N. 1993. Cell 72: 31-41
14. Membrane Transport in Biology, 1978. Giebisch. G., Tostenson. D. C., Ussing. H. H. editrs., Springer-Verlag Berlin. Heidelberg. New-York
15. Mathies, R. A., Lin, S. W., Ames, J. B., Pollard, W. T. 1991. Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem. 20: 491-518

BCU "CAROL DAVILA" UNIVERSITY LIBRARY

16. Luchian, T., Tokaji, Z., Dancshazy, Z. 1996. FEBS Lett. 386: 55-59
17. Henderson, R. and P.N.T. Unwin 1975. Nature 257: 28-38
18. Numa, S. 1989. Harvey Lect. 83: 121-165
19. Changeaux, J. P. et al. 1992. Trends Pharmacol. Sci. 13: 299-301
20. Karlin, A. 1993. Curr. Opin. Neurobiol. 3: 299-309
21. Lena, C. and J. P. Changeaux 1993. Trends Neurosci. 16: 181-186
22. Sine, S. M. and P. Taylor 1980. J. Biol. Chem. 255: 10144-10156
23. Eisenberg, R. S. 1996. J. Membr. Biol. 150: 1-25
24. Molecular Cell Biology (3rd edition), 1995. Lodish, H., Baltimore, D., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., Darnell, J. W. H. Freeman and Company, New York
25. Oh, U., Ho, Y. K., Kim, D. 1995. J. Membr. Biol. 147: 241-253
26. Hille, B. 1992. Neuron 9: 187-195
27. Handbook of Membrane Channels, 1994. Peracchia, C., Academic Press, N.Y.
28. Miller, C. 1989. Neuron 2: 1195-1205
29. Montal, M. 1995. Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 24: 31-57
30. Huganir, R. L., Miles, K., Greengard, P. 1984. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 81: 6963-6972
31. Yee, G. H. and R. L. Huganir 1987. J. Biol. Chem. 262: 16748-16753
32. Huganir, R..L. and K. Miles 1989. Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 24: 182-215
33. Huganir, R. L. and P. Greengard 1990. Neuron 5: 555-567
34. Hodkin, A. L., Huxley, A. F., Katz, B. 1952. J. Physiol. (London) 108: 37-77
35. Cole, K. S. 1949. Arch. Sci. Physiol. 3: 253-258
36. Hodkin, A. L. and A. F. Huxley 1952 a. J. Physiol. (London) 116: 449-472
37. Lester, H. A. 1991. Annu. Rev. Physiol. 53: 477-496
38. Narahashi, T. 1974. Physiol. Rev. 54: 813-889
39. Henderson, R. and J. H. Wang 1972. Biochemistry 11: 4565-4569
40. Catterall, W. A. 1988. Science 242: 50-61
41. Ion Channel Reconstruction, 1986. Miller, C. Plenum Press, New York

BCU "LUCIAN BLAGA" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

42. Barachi, R., Cohen, S., Murphy, L. 1980. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77: 1306-1309

43. Trimmer, J. S. and W. S. Agnew 1989. Annu. Rev. Physiol. 51: 401-418

44. Duch, D. S. and S. R. Levinson 1987. J. Membr. Biol. 98: 43-52

45. Tamkun, M., Talvenheimo, J., Catterall, W. 1984. J. Biol. Chem. 259: 1688

46. Furman, R., Tanaka, J., Mueller, P., Barchi, R. L. 1986. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83: 488

47. Roberts, R. H. and R. L Barchi 1987. J. Biol. Chem. 262: 2298

48. Gordon, D., Merrick, D., Wallner, D., Catterall, W. A. 1988. Biochemistry 27: 7032

49. Jan, L. Y and Y. N. Jan 1992. Annu. Rev. Physiol. 54: 537-555

50. Sigworth, F. J. 1993. Q. Rev. Biophys. 27: 1-40

51. Hoshi, T., Zagotta, W. N., Aldrich, R. W. 1990. Science 250: 533-538

52. Wei, A., Cavarrubias, M., Butler, A., Baker, K., Pak, M. 1990. Science 248: 599-603

53. Armstrong, C. M. 1981. Physiol. Rev. 61: 644-683

54. Almers, W. 1978. Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 82: 96-190

55. Armstrong, C. M. and F. Bezanilla 1974. J. Gen. Physiol. 63: 533-552

56. Dascal, N. and I. Lotan 1992. In: Methods in Molecular Neurobiology 13. A. Longstaff and P. Revert editrs., Totowa NJ: Humana Press, 205-225

57. Single-Channel Recording (2nd Edition). 1995. B. Sakmann and E. Neher. Plenum Press

58. The Axon Guide for Electrophysiology & Biophysics Laboratory Techniques, 1993. Axon Instruments, Inc.

59. Schreibmayer, W., Lester, H. A., Dascal, N. 1994. Pfluegers Arch. 426: 453-458

60. Hill, A. V. 1913. Biochem. J. 7: 471-480

61. Jordan, P. C. 1982. Biophys. J. 39: 157-164

62. Jordan, P. C. 1984. Biophys. J. 45: 1091-1100

63. The Theory of Stochastic Processes. 1980. Cox, D. R. and H. D. Miller., Chapman and Hall, New York

64. Cooper, K., Jakobsson, E., Wolynes, P. 1985. Prog. Biophys. Molec. Biol. 46: 51-96

BCU CLUJ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

65. Hille, B. 1975. J. Gen. Physiol. 66: 535-560
66. Introduction to Membrane Noise, 1981. DeFelice, L. J., Plenum Press, New York
67. Neumke, B. 1982. Int. Rev. Neurobiol. 23: 35-67
68. Adams, D. J., Alewood, P. F., Craik, D. J., Drinkwater, R. D., Lewis, R. J. 1999. Drug Dev. Res. 46: 219-234
69. Wheller, D.B., Randall, A., Tsien, R.W. 1994. Science 264: 107-111
70. Cooper, K., Jakobsson, E., Wolznes, P. 1985. Prog. Biophys. Molec. Biol. 46: 51-96
71. Cooper, K. E., Gates, P. Y., Eisenberg, R. S. 1988. Quarterly Rev. Biophys. 21: 331-364
72. Nowycky, M.C., Fox, A.P., Tsien, R.W. 1985. Nature 316: 440-442
73. Intermolecular and Surface Forces, 1987. Israelachvili, N. J., Academic Press
74. Walker, D., De Waard, M. 1998. Trends Neurosci. 21: 148-154
75. Biofizică moleculară şi supramoleculară, 1997. Popescu, A. I., Editura All (Bucureşti)
76. Statistical Physics, 1991. Kubo, R., Toda, M., Hashitsume, N., Springer-Verlag
77. Williams, M.E., Brust, P.F., Feldman, D.H., Patthi, S., Simerson, S., Maroufi, A., McCue, A.F., Velicelbi, G. Ellis, S.B., Harpold, M.M. 1992. Science 257: 389-395
78. Luchian, T., 2000. Rev. Roum. Chim. *in press*
79. Stochastic Processes in Physics and Chemistry, 1992. Van Kampen N. G., North Holland
80. Laio, A., Torre, V. 1999. Biophys. J. 76:129-148

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Anexe

Codul genetic standard

UUU	Phe	UCU	Ser	UAU	Tyr	UGU	Cys
UUC	Phe	UCC	Ser	UAC	Tyr	UGC	Cys
UUA	Leu	UCA	Ser	UAA	Stop	UGA	Stop
UUG	Leu	UCG	Ser	UAG	Stop	UGG	Trp
CUU	Leu	CCU	Pro	CAU	His	CGU	Arg
CUC	Leu	CCC	Pro	CAC	His	CGC	Arg
CUA	Leu	CCA	Pro	CAA	Gln	CGA	Arg
CUG	Leu	CCG	Pro	CAG	Gln	CGG	Arg
AUU	Ile	ACU	Thr	AAU	Asn	AGU	Ser
AUC	Ile	ACC	Thr	AAC	Asn	AGC	Ser
AUA	Ile	ACA	Thr	AAA	Lys	AGA	Arg
AUG	Met	ACG	Thr	AAG	Lys	AGG	Arg
GUU	Val	GCU	Ala	GAU	Asp	GGU	Gly
GUC	Val	GCC	Ala	GAC	Asp	GGC	Gly
GUA	Val	GCA	Ala	GAA	Glu	GGA	Gly
GUG	Val	GCG	Ala	GAG	Glu	GGG	Gly

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Simbolurile utilizate pentru aminoacizi

A	Ala	Alanina
B	Asx	Asparagina sau Acid aspartic
C	Cys	Cisteina
D	Asp	Acid aspartic
E	Glu	Acid glutamic
F	Phe	Fenilalanina
G	Gly	Glicina
H	His	Histidina
I	Ile	Izoleucina
K	Lys	Lisina
L	Leu	Leucina
M	Met	Metionina
N	Asn	Asparagina
P	Pro	Prolina
Q	Gln	Glutamina
R	Arg	Arginina
S	Ser	Serina
T	Thr	Threonina
V	Val	Valina
W	Trp	Triptofan
Y	Tyr	Tirosina
Z	Glx	Glutamina sau Acid glutamic

BCU IASI

Constante fizice universale

Constanta fizică	Simbol	Valoare
Unitate atomică de masă (dalton)	Da	1.660×10^{-24} g
Numărul lui Avogadro	N	6.022×10^{23} mol^{-1}
Constanta lui Boltzmann	k	1.381×10^{-23} J grad^{-1}
Electron volt-ul	eV	1.602×10^{-19} J
Constanta lui Faraday	F	9.649×10^{4} C mol^{-1}
Curie	Ci	3.70×10^{10} dezintegrari s^{-1}
Constanta generală a gazelor	R	8.315 J mol^{-1} grad^{-1}
Constanta lui Planck	h	6.626×10^{-34} J s
Viteza luminii în vid	c	2.998×10^{8} m s^{-1}

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tehnoredactor: AL. CVASNÂI

TIPARUL EXECUTAT LA
IMPRIMERIA EDITURII UNIVERSITĂȚII
„ALEXANDRU IOAN CUZA" DIN IAȘI

Format: 70×100/16
Coli tipo: 16,50
Apărut: 2001
Comanda: 1199

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY